

Aus dem  
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

---

# **Untersuchung verschiedener in Sachsen angewandter Impfstrategien zur Vorbeugung der *Salmonella* Enteritidis- Infektion in Legehennenbeständen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae (Dr.med.vet.)  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von

**Cornelia Käser**  
aus Überlingen

Leipzig, 2012

---

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Professor Dr. Uwe Truyen

Betreuer: Professor Dr. Uwe Truyen

Gutachter:

1. Gutachter: Professor Dr. Uwe Truyen,  
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der  
Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
2. Gutachter: Professor Dr. Mohamed Hafez,  
Institut für Geflügelkrankheiten der Veterinärmedizinischen Fakultät der  
Freien Universität Berlin

Tag der Verteidigung: 3. Juli 2012

---

Meiner Familie und Florian

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Salmonellen, ihre Wirtsspezifität und Wirtspathogenität .....</b>	<b>3</b>
2.1.1	Salmonellen allgemein .....	3
2.1.2	Wirtsspezifische Salmonellen .....	3
2.1.3	Nicht-wirtsspezifische Salmonellen .....	4
2.1.4	Beschränkt-wirtsspezifische Salmonellen .....	5
<b>2.2</b>	<b>Epidemiologie .....</b>	<b>5</b>
2.2.1	Bedeutung der nicht-wirtsspezifischen Salmonelleninfektion .....	5
2.2.2	Salmonellen in Legehennenbeständen .....	6
2.2.3	Salmonelleninfektion des Menschen .....	7
<b>2.3</b>	<b>Rechtliche Grundlagen zur Legehennenhaltung .....</b>	<b>8</b>
2.3.1	EU-Ebene .....	8
2.3.1.1	Verordnung (EG) Nr. 2160/2003 .....	8
2.3.1.2	Verordnung (EG) Nr. 1168/2006 .....	8
2.3.1.3	Verordnung (EG) Nr. 1177/2006 .....	9
2.3.2	Nationale Ebene .....	10
2.3.2.1	Verordnung zum Schutz gegen bestimmte Salmonellen-Infektionen beim Haushuhn (Hühner-Salmonellen-VO) .....	10
<b>2.4</b>	<b>Die Salmonelleninfektion von Huhn und Ei .....</b>	<b>10</b>
2.4.1	Die intestinale Infektion .....	10
2.4.2	Die Infektion des Ovars .....	11
2.4.3	Die Infektion des Oviduktes .....	12
2.4.4	Die Infektion des Eies außerhalb des Hühnerkörpers .....	13
<b>2.5</b>	<b>Das Immunsystem des Huhnes und die Reaktion auf Salmonellen .....</b>	<b>13</b>
2.5.1	Die zellulär vermittelte Immunabwehr .....	14
2.5.1.1	Intestinal .....	14
2.5.1.2	Systemisch .....	15
2.5.2	Die humoral vermittelte Immunabwehr .....	16
2.5.2.1	Intestinal .....	16
2.5.2.2	Systemisch .....	17
2.5.3	Einflüsse auf die Immunabwehr .....	18
<b>2.6</b>	<b>Bekämpfungsmaßnahmen gegen die Salmonelleninfektion .....</b>	<b>19</b>
2.6.1	Hygiene .....	19
2.6.2	Impfung und Adjuvantien .....	19
2.6.2.1	Salmonellenimpfstoffe .....	19
2.6.2.2	Lebendimpfstoffe .....	21
2.6.2.3	Inaktivatimpfstoffe .....	24
2.6.3	Futterzusätze .....	26
2.6.3.1	Präbiotika .....	26
2.6.3.2	Probiotika .....	26
2.6.3.3	Immunstimulanzien .....	27
2.6.3.4	Competitive Exclusion .....	27
2.6.4	Resistente Hühnerlinien .....	28
2.6.5	Haltung und „Animal Welfare“ .....	28

**3 TIERE, MATERIAL UND METHODEN.....30**

<b>3.1 Tiere und Material.....</b>	<b>30</b>
3.1.1 Tiere .....	30
3.1.2 Tierversuchsgenehmigung .....	30
3.1.3 Haltung .....	31
3.1.4 Reinigung und Desinfektion.....	31
3.1.5 Impfschemata, Impfstoffe .....	31
3.1.6 Infektionsstamm.....	32
3.1.6.1 Herkunft und Charakteristika .....	32
3.1.6.2 Aufbewahrung.....	32
3.1.6.3 Nährmedien .....	33
<b>3.2 Methoden.....</b>	<b>36</b>
3.2.1 Allgemeiner Versuchsaufbau.....	36
3.2.2 Infektion .....	39
3.2.2.1 Herstellung des Inokulums und Bestimmung der Infektionsdosis.....	39
3.2.2.2 Verabreichung und Dosierung .....	40
3.2.3 Klinische und pathologisch-anatomische Diagnostik.....	40
3.2.4 Kulturelle Diagnostik.....	40
3.2.4.1 Kloakentupferproben .....	40
3.2.4.2 Organproben.....	42
3.2.5 Statistische Auswertung .....	44

**4 ERGEBNISSE.....46**

<b>4.1 Salmonellengehalt des Inokulums.....</b>	<b>46</b>
<b>4.2 Nachweis der Salmonellenfreiheit .....</b>	<b>46</b>
<b>4.3 Ergebnisse der Gruppen im Versuchsverlauf .....</b>	<b>46</b>
4.3.1 Gruppe A .....	46
4.3.1.1 Klinische Beobachtungen .....	47
4.3.1.2 Ausscheidung des Infektionsstammes .....	47
4.3.1.3 Pathologisch-anatomische Beobachtungen .....	47
4.3.1.4 Caecumwand und Caecuminhalt.....	47
4.3.1.5 Leber.....	49
4.3.1.6 Reproduktionsorgane .....	50
4.3.2 Gruppe B .....	50
4.3.2.1 Klinische Beobachtungen .....	50
4.3.2.2 Ausscheidung des Infektionsstammes .....	51
4.3.2.3 Pathologisch-anatomische Beobachtungen .....	51
4.3.2.4 Caecumwand und Caecuminhalt.....	51
4.3.2.5 Leber.....	53
4.3.2.6 Reproduktionsorgane .....	54
4.3.3 Gruppe C .....	54
4.3.3.1 Klinische Beobachtungen .....	54
4.3.3.2 Ausscheidung des Infektionsstammes .....	55
4.3.3.3 Pathologisch-anatomische Beobachtungen .....	55
4.3.3.4 Caecumwand und Caecuminhalt.....	55
4.3.3.5 Leber.....	57
4.3.3.6 Reproduktionsorgane .....	58
4.3.4 Gruppe D .....	58
4.3.4.1 Klinische Beobachtungen .....	59
4.3.4.2 Ausscheidung des Infektionsstammes .....	59

4.3.4.3	Pathologisch-anatomische Beobachtungen .....	59
4.3.4.4	Caecumwand und Caecuminhalt.....	59
4.3.4.5	Leber.....	61
4.3.4.6	Reproduktionsorgane .....	62
4.3.5	Gruppe E .....	62
4.3.5.1	Klinische Beobachtungen .....	63
4.3.5.2	Ausscheidung des Infektionsstammes .....	63
4.3.5.3	Pathologisch-anatomische Beobachtungen .....	63
4.3.5.4	Caecumwand und Caecuminhalt.....	63
4.3.5.5	Leber.....	65
4.3.5.6	Reproduktionsorgane .....	66
<b>4.4</b>	<b>Ergebnisse der Gruppen im Vergleich .....</b>	<b>67</b>
4.4.1	Vergleich der Gruppen A und D.....	67
4.4.1.1	Ausscheidung des Infektionsstammes .....	67
4.4.1.2	Caecumwand und Caecuminhalt.....	68
4.4.1.3	Leber.....	69
4.4.1.4	Reproduktionsorgane .....	71
4.4.2	Vergleich der Gruppen C und E.....	71
4.4.2.1	Ausscheidung des Infektionsstammes .....	71
4.4.2.2	Caecumwand und Caecuminhalt.....	72
4.4.2.3	Leber.....	73
4.4.2.4	Reproduktionsorgane .....	75
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>76</b>
<b>5.1</b>	<b>Verlauf der Salmonelleninfektionen innerhalb der Gruppen.....</b>	<b>76</b>
5.1.1	Klinische Beobachtungen .....	76
5.1.2	Untersuchung der Kloakentupfer.....	77
5.1.3	Untersuchung der Blinddärme.....	78
5.1.3.1	Pathologisch-anatomische Untersuchung .....	78
5.1.3.2	Reisolierung des Infektionsstammes .....	78
5.1.4	Untersuchung der Leber .....	80
5.1.4.1	Pathologisch-anatomische Untersuchung .....	80
5.1.4.2	Reisolierung des Infektionsstammes .....	80
5.1.5	Untersuchung der Reproduktionsorgane.....	83
5.1.5.1	Pathologisch-anatomische Untersuchung .....	83
5.1.5.2	Reisolierung des Infektionsstammes .....	84
<b>5.2</b>	<b>Vergleich der Impfschemata (MLV vs. MLV und KV) .....</b>	<b>85</b>
<b>5.3</b>	<b>Versuchsdurchführung.....</b>	<b>88</b>
<b>5.4</b>	<b>Schlussfolgerungen .....</b>	<b>91</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>95</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>97</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>115</b>

<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>133</b>
-----------	-------------------------	------------

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	Antigen präsentierende Zellen
BCR	B-Zell-Rezeptor
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bidest.	bidestillata
BPLS	Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar
c	Konzentration
ca.	circa
°C	Grad Celsius
CE	Competitive Exclusion
ChIFN $\gamma$	<i>chicken</i> -Interferon $\gamma$ (Hühner-Interferon $\gamma$ )
cm	Zentimeter
CMI	<i>cell-mediated-immunresponse</i> (zellulär vermittelte Immunantwort)
d	Tag(e)
d.p.inf.	Tage <i>post infectionem</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> (Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit)
EG	Europäische Gemeinschaft
EU	Europäische Union
FVE	Federation of Veterinarians of Europe
FOS	Fructooligosaccharide
FSA	<i>Food Standards Agency</i> (Behörde zur Überwachung der Lebensmittelsicherheit)
g	Gramm
GALT	<i>Gut-Associated Lymphoid Tissue</i> (Darm-assoziiertes lymphoides Gewebe)
ggr.	geringgradig
GIT	Gastro-Intestinal-Trakt
h	Stunde(n)
HWZ	Halbwertszeit
IgA	Immunglobulin vom Isotyp A
IgG	Immunglobulin vom Isotyp G
IgM	Immunglobulin vom Isotyp M
IgY	Immunglobulin vom Isotyp Y (vogelspezifisch)
IL	Interleukin
ISCOMs	<i>Immune stimulating complexes</i> (immunstimulierende Komplexe)
KbE	Kolonie bildende Einheiten
KV	Inaktivatvakzine
log	Logarithmus
LT	Lebenstag(e)
LW	Lebenswoche
MALT	<i>mucosa-associated-lymphoid tissue</i> (Mucosa-assoziiertes lymphoides Gewebe)
mg	Milligramm



MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minuten
ml	Milliliter
MLV	<i>modified live vaccine</i> (modifizierte Lebendvakzine)
mm	Millimeter
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
MS	Mitgliedstaaten der EU
ND	<i>Newcastle Disease</i> (New-Castle-Krankheit)
NK	Natürliche Killerzellen
OD	optische Dichte
OSA	Objektträgerschnellagglutination
PASW	<i>Predictive Analysis Software</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Nal	Nalidixinsäure
Nal <sup>r</sup>	Nalidixinsäure-resistent
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
pH	potential hydrogenii
RKI	Robert Koch Institut
S.	<i>Salmonella</i>
s.	siehe
SE	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis
SEF14	<i>Salmonella</i> Enteritidis Fimbrien 14
SG	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serovar Gallinarum
SIgA	sekretorische Antikörper vom Isotyp A
SPI	<i>Salmonella Pathogenicity Island</i> (Salmonellen Pathogenitätsinseln)
STM	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium
ssp.	Subspezies
Tab.	Tabelle
Th 1	T-Helferzellen vom Typ 1
Th 2	T-Helferzellen vom Typ 2
TSK	Tierseuchenkasse
V.	<i>Vena</i>
VO	Verordnung
WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)
XLD	Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar
ZDG	Zentralverband der deutschen Geflügelwirtschaft e.V.

# 1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Nicht-wirtsspezifische Salmonellen, im Besonderen die Serovare *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Enteritidis (SE) und *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Typhimurium (STM), sind bis heute als Zoonoseerreger von großer Relevanz. Die Zahl durch diese Serovare hervorgerufenen humanen Salmonellosen stieg weltweit bis Mitte der 90er Jahre an und nahm dann aufgrund verschiedener Bekämpfungsmaßnahmen stetig ab. Zu diesen Bekämpfungsmaßnahmen gehörten u.a. das gesteigerte Hygienemanagement und die Durchführung von Impfungen auf Ebene der Primärproduktion von Lebensmitteln tierischen Ursprungs. Eine rechtliche Grundlage für die Salmonellenbekämpfung auf allen relevanten Herstellungs-, Verarbeitungs- und Vertriebsstufen, insbesondere auf der Ebene der Primärproduktion, wurde durch die Zoonosen-Bekämpfungs-Verordnung (VO) der Europäischen Gemeinschaft (EG) (VO EG Nr. 2160/2003) geschaffen. Bis jetzt war eine Eradikation allerdings nicht möglich. Epidemiologische Analysen sprechen für Eier und Eiprodukte als Hauptinfektionsquelle des Menschen für SE, weshalb der Produktion dieser Lebensmittel besondere Beachtung beigemessen werden muss. Daher wurde im Jahre 2006 die VO (EG) 1168/2006 zur Eindämmung der Salmonellen-Prävalenz bei Legehennen erlassen. In dieser Verordnung wurde das sogenannte Gemeinschaftsziel (prozentuale Verringerung positiver Herden erwachsener Legehennen um mindestens 10% im Falle einer Prävalenz von weniger als 10 im Vorjahr, bzw. Verringerung des Höchstprozentsatzes auf 2%) definiert, das von den EU-Mitgliedstaaten ab dem Jahr 2008 umzusetzen war. Dieses Gemeinschaftsziel konnte in Deutschland im Jahr 2008, jedoch nicht im Jahr 2009 eingehalten werden. Die Zahl SE- oder STM-infizierter Legehennenherden stieg von 2008 auf 2009 von 2,7% auf 4,8%. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass eine verbesserte Berichterstattung durch die zuständigen Behörden die höhere Prävalenz bedingt. Die häufigste Serovar stellte im Jahre 2009 mit 4,5% der 4,8% positiven Legehennenherden wie schon seit Jahren SE dar. Daher besteht in Deutschland gemäß Hühner-Salmonellen-VO in Legehennen-Aufzuchtbetrieben Impfpflicht gegen diese Serovar.

Werden SE oder STM in einem Legehennenbestand nachgewiesen, dürfen die produzierten Eier nicht mehr als Konsum Eier in den Handel gegeben werden. Die Hühner-Salmonellen-VO schreibt vor, dass sie nur an zugelassene Verarbeitungsbetriebe für Eiprodukte geliefert oder als Klasse-B-Eier, die fast ausschließlich für die Nahrungsmittelindustrie bestimmt sind und daher unter dem Wert der Klasse-A-Eier gehandelt werden, vermarktet bzw. zur unschädlichen Beseitigung oder für diagnostische Zwecke verwendet werden dürfen. Dies kann große wirtschaftliche Verluste für den Erzeuger verursachen. Aufgrund der geringen Gewinnmarge bleibt häufig nur die Schlachtung der Tiere, da die laufenden Kosten nicht gedeckt werden können. Die Legehennenhalter haben

aus diesem Grund ein großes Interesse am Schutz ihrer Tiere vor diesen Salmonellen und versuchen sie u.a. durch die Durchführung verschiedener Impfstrategien zu bekämpfen.

Im „Leitfaden zur Salmonellenbekämpfung bei Legehennen“, den der Zentralverband der deutschen Geflügelwirtschaft e.V. (ZDG) als freiwillige Orientierungshilfe für die Geflügellandwirte erstellt hat, sind diese Impfkonzepte wiedergegeben. Als Standardimpfung wird die Impfung mit modifizierten Lebendvakzinen empfohlen, die die lokalen intestinalen, humoralen und im Besonderen zellulären Abwehrmechanismen induzieren sollen. Bei stärker gefährdeten Herden wird eine zusätzliche einmalige Impfung mit einem Inaktivatimpfstoff bei der Einstellung in den Legebetrieb angeraten, um einen Abfall der Immunität am Ende der Legeperiode zu verhindern. Die Nutzung der Legehennen wurde in den letzten Jahren auf bis zu 70 Lebenswochen (LW) ausgedehnt, die Impfstoffhersteller garantieren jedoch teilweise nur eine Immunität bis zu 50 LW.

Diese Dissertation untersucht die fünf verschiedenen im Freistaat Sachsen angewandten und vom ZDG empfohlenen Impfkonzepten gegen SE bei kommerziell gehaltenen Legehennen zu drei verschiedenen Zeitpunkten der Legeperiode (39., 54. und 69. Lebenswoche). Jedes Impfkonzept war zu jedem Versuchszeitpunkt durch eine Versuchsgruppe von zwölf Legehennen vertreten. Die Tiere wurden mit SE infiziert und zwei bzw. sieben Tage nach der Infektion euthanasiert. Es wurden die Blinddärme, die inneren Organe Leber, Ovar und Ovidukt entnommen und ein qualitativer sowie quantitativer Nachweis des Infektionsstammes in diesen Organen durchgeführt. Die Ausscheidung des Infektionsstammes wurde mithilfe der Untersuchung von Kloakentupfern ein, drei und fünf Tage nach der Infektion kontrolliert.

Schwerpunkt der Auswertung lag einerseits bei dem Verlauf des Impfschutzes der Tiere während der Legeperiode innerhalb einer Impfgruppe. Andererseits wurde der Impfschutz der Tiere, die ausschließlich mit modifizierten Lebendimpfstoffen geimpft wurden mit dem Impfschutz der Tiere, die zudem mit einer Inaktivatvakzine immunisiert wurden, verglichen. Es sollte festgestellt werden, ob die kostenintensivere und aufwendigere Zusatzimpfung mit einem Inaktivatimpfstoff einen Vorteil gegenüber der Impfung mit ausschließlich Lebendimpfstoffen darstellt, und in wie weit die angewandten Impfstrategien einen ausreichenden Schutz gegen SE bis zum Ende der Legeperiode bieten.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Salmonellen, ihre Wirtsspezifität und Wirtspathogenität

#### 2.1.1 Salmonellen allgemein

Salmonellen sind gram-negative 0,7-1,5 x 2,0-5,0 µm große stäbchenförmige Bakterien, die zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehören. Sie sind fakultativ anaerob, in der Regel peritrich begeißelt und damit beweglich (POPOFF und LE MINOR 2005). Die Serovar *S. enterica* ssp. *enterica* serovar Gallinarum (SG) ist jedoch unbeweglich. Eingeteilt wird das Genus *Salmonella* in die drei Spezies *S. enterica*, *S. bongori* und *S. subterranea* (SHELOBOLINA et al. 2004; ANON. 2005). Die Spezies *S. enterica* kann in sechs Subspezies unterteilt werden: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* und *indica*. Zu der Subspezies *S. enterica* ssp. *enterica* gehören die Serovare *S. enterica* ssp. *enterica* serovar Enteritidis (SE) und *S. enterica* ssp. *enterica* serovar Typhimurium (STM). *S. enterica* ssp. *enterica* umfasst ca. 1500 Serovare, die gemäß dem White-Kauffmann-Le Minor-Schema eingeteilt und bezeichnet werden (GRIMONT und WEILL 2007). Für jede Serovar wird eine antigenetische Formel definiert, die sich auf die Oberflächenantigene O (somatisch), Vi (kapsulär) und H (flagellär) bezieht. Gemäß ihrer O-Antigene werden die Serovare in Gruppen eingeteilt, SE zählt dementsprechend zur Gruppe D 1 (POPOFF und LE MINOR 2005).

Die variable Antigenität weist auf die genetische Vielfalt des Genus *Salmonella* hin. Salmonellen zeichnen sich durch eine hohe Anpassungsfähigkeit, Vermehrungsrate und Widerstandsfähigkeit aus, weshalb sie in der Umwelt weit verbreitet sind (BFR 2010). Über 70 Virulenzgene und zehn „*Salmonella* Pathogenitätsinseln“ (SPI) konnten bis jetzt identifiziert werden, die je nach Umgebungsbedingungen exprimiert bzw. reguliert werden. So wird das Überleben unter verschiedensten Umweltbedingungen und die lokale oder systemische Infektion von Mensch und Tier möglich (HENSEL 2006; ANDREWS-POLYMENIS et al. 2006).

Von den zurzeit insgesamt über 2500 bekannten Salmonellen-Serovaren sind nur die wenigsten pathogen und haben eine Bedeutung für Mensch und/oder Tier. Je nachdem, wie sehr eine pathogene Serovar an ihren Wirt adaptiert ist, kann sie einer der folgenden zwei bzw. drei Gruppen zugeordnet werden.

#### 2.1.2 Wirtsspezifische Salmonellen

Bei der ersten Gruppe handelt es sich um die „streng-wirtsspezifischen“ Salmonellen-Serovare (z.B. *S. enterica* ssp. *enterica* serovar Typhi beim Mensch), die fast exklusiv bei einer bestimmten Tierart/Mensch vorkommen und typischerweise schwere systemische

Infektionen verursachen. Wirtsspezifische Serovare scheinen im Gegensatz zu den nicht-wirtsspezifischen Serovaren eine Entzündung der Darmwand zu vermeiden, was ein Umgehen der lokalen Immunabwehr und damit eine systemische Ausbreitung ermöglicht (WALLIS 2006). Dies kann zu schweren typhösen Erkrankungen führen (VAN IMMERSEEL et al. 2005). Sie besiedeln charakteristischerweise die reproduktiven Organe, infizieren Eier bzw. den Fetus (z.B. SG (Erreger des Hühertyphus), *S. enterica ssp. enterica* serovar Abortusovis), was zu stark kontaminiertem Ei- bzw. Abortmaterial führen kann. Auf diese Weise wird eine Verbreitung des Erregers garantiert (WALLIS 2006).

### **2.1.3 Nicht-wirtsspezifische Salmonellen**

Die zweite Gruppe umfasst die „nicht-wirtsspezifischen“ Serovare (z.B. SE bei Mensch, Huhn und Wiederkäuern), die bei einem breiten Spektrum von Wirten überwiegend subklinische gastro-intestinale Infektionen hervorrufen. WATSON et al. (1998) konnten zeigen, dass die nicht-wirtsspezifische STM eine stärkere enteropathogene Reaktion in bovinem Ileum hervorruft als wirtsspezifische Serovare. Die pathogenetischen Prozesse können zu Durchfall führen, was die Verbreitung der Salmonellen in der Umwelt und somit das Risiko einer fäkal-oralen Infektion fördert (WALLIS 2006). Bei Hühnern, die eine große Bedeutung als Nahrungsmittellieferanten haben, sind diese Serovare in der Lage, innere Organe zu besiedeln, die zum menschlichen Verzehr geeignet sind (HUMPHREY 2005). Nur wenige SE-Phagentypen wie Phagentyp 4 verhalten sich derartig invasiv, dass sie insbesondere bei jungen Hühnern schwere systemische Infektionen mit Anorexie und hochgradigem Durchfall verursachen können (POPPE et al. 1993; DHILLON et al. 1999; WALLIS 2005).

SE verfügt wie die wirtsspezifische SG über die Fähigkeit, den Reproduktionstrakt von Hühnern zu besiedeln, Eier zu kontaminieren und sich auf diesem Weg zu verbreiten. Thomson et al. (2008) konnten mithilfe komparativer Genomanalyse der beiden Serovare zeigen, dass sich die unbewegliche SG aus der nicht-wirtsspezifischen SE entwickelt sowie durch Deletion und der Bildung von Pseudogenen eine strikte Wirtsspezifität erlangt hat. Beide Serovare gehören der Serogruppe D1 an. Sie tragen die speziellen *Salmonella* Enteritidis Fimbrien 14 (SEF 14), die für die Kolonisierung von Reproduktionsgewebe und Eiern während deren Formation wichtig sind (TURCOTTE und WOODWARD 1993). Im Gegensatz zu SG ist SE trotz der Ähnlichkeit deutlich weniger invasiv, was die inneren Organe Leber und Milz betrifft, und verursacht daher eine weniger klinische Symptomatik (EFSA 2010). Bei gesunden adulten und ungestressten Tieren verläuft auch die systemische Infektion mit SE in der Regel nur subklinisch, was den Eintritt der Salmonellen in die Lebensmittelkette erleichtert (HUMPHREY 2005). Die infizierten Tiere können ein latentes Erregerträger-Dasein, den sogenannten Carrier-Status, entwickeln und sind aufgrund des Ausbleibens klinischer Symptome nur schwer zu identifizieren (CALENGE et al. 2010).

### 2.1.4 Beschränkt-wirtsspezifische Salmonellen

Einige Autoren benennen eine dritte Gruppe, die die „beschränkt-wirtsspezifischen“ Salmonellen (z.B. *S. enterica* ssp. *enterica* serovar Dublin bei Wiederkäuern und Schweinen) umfasst, die meist mit ein bis zwei nahverwandten Wirten assoziiert sind und nur in seltenen Fällen Infektionen bei anderen Spezies verursachen (WALLIS 2005).

## 2.2 Epidemiologie

### 2.2.1 Bedeutung der nicht-wirtsspezifischen Salmonelleninfektion

Die nicht-wirtsspezifischen Salmonellen nehmen in der Problematik der humanen Salmonellose eine wichtige Rolle ein. Humane zoonotische Salmonellose gehören zu den bedeutendsten Lebensmittelinfektionen (EFSA 2004) und verzeichnen im Vergleich zu anderen Lebensmittelinfektionen die meisten tödlichen Verläufe. Gemäß EFSA (2010) haben die Serovare SE, gefolgt von STM mit 80% aller typisierten Isolate beim Menschen in der EU die größte Bedeutung (EFSA 2004; HUMPHREY 2005; EFSA 2010). In der Hühner-Salmonellen-VO werden die beiden Serovare daher als Salmonellen der Kategorie 1 definiert. Zu den Salmonellen der Kategorie 2 werden die Serovare *S. enterica* ssp. *enterica* serovar Virchow, *S. enterica* ssp. *enterica* serovar Infantis und *S. enterica* ssp. *enterica* serovar Hadar gezählt, die gleichermaßen zu Lebensmittelinfektionen führen können, aber jeweils für weniger als 1% der Erkrankungen verantwortlich sind (METHNER 2007; EFSA 2010). Das Vorkommen der letztgenannten Serovare ist rechtlich nur in Brütereien und Zuchtbetrieben, jedoch nicht in den Aufzucht- und Legehennenbetrieben relevant (ANON. 2009).

Im Verlauf der letzten 20 Jahre hat diese Salmonellen-Problematik an Bedeutung zugenommen, denn die Zahl der humanen Infektionen stieg in Westeuropa bis Mitte der 90er Jahre stetig an (WARD et al. 2000; GUARD-PETTER 2001). Ursachen für diese von manchen Autoren als „S. Enteritidis-Pandemie“ bezeichnete Entwicklung, ist einerseits die (i) extraordinary vertikale Verbreitung von sich jüngst entwickelten Stämmen und andererseits (ii) die zentralisierte Zucht, wodurch die Infektion weit verbreitet werden konnte (THORNS CJ 2000; EFSA 2010). Wie RABSCH (2000) berichtete, könnte ein weiterer Grund für die Verbreitung von SE die Bekämpfung von *S. Gallinarum* biovar Pullorum seit den 80er Jahren sein. Seit 1990 müssen für den EU-weiten Handel Kontrolluntersuchungen auf *S. Gallinarum* biovar Pullorum in den Herkunftsbetrieben durchgeführt werden (ANON. 1990). Positive Reagenten werden gemerzt, Impfungen sind verboten (TSK SACHSEN 1995; ANON. 2009). Infolge dieser Maßnahmen scheint die Herdenimmunität gegen das O:9-Antigen der D1-Gruppe verloren gegangen zu sein und die Tiere reagieren empfindlicher auf SE (RABSCH 2000).

Nach dem „Salmonellen-Peak“ sank die Herdenprävalenz aufgrund der Einführung von Eradikationsprogrammen gegen SE (und STM) basierend auf Impfungen und verbessertem Hygienemanagement in den verschiedenen EU-Mitgliedstaaten (WEGENER et al. 2003). Weiterhin bildete sich COGAN und HUMPHREY (2003) zufolge im Laufe der Jahre eine Immunität aus. Beispielsweise konnte in Dänemark die Herdenprävalenz von 13,4% (1998) auf 0,4% (2006) reduziert werden und damit auch die Zahl humaner Salmonellosen (KORSGAARD et al. 2009). In Deutschland bzw. Gesamtwesteuropa (WHO 2000; FISCHER 2001; METHNER 2007; RKI 2010) und den USA (MARCUS et al. 2004; MUMMA et al. 2004) sank die Zahl humaner Salmonellosen ebenfalls.

Trotz der Prävalenz-Reduktion ist die Salmonellenproblematik immer noch aktuell, unter anderem (u.a.) bedingt durch das in der Umwelt persistierende Salmonellen-Reservoir, das im Folgenden näher beschrieben wird (CRESPO et al. 2005; WALES et al. 2007).

### **2.2.2 Salmonellen in Legehennenbeständen**

Hühnerställe können nie vollständig von der Umwelt abgeschirmt werden. Futter, Einstreu, Luftzirkulation, aber auch belebte Faktoren, z.B. Mitarbeiter und Tiere wie Vögel, Nager und Insekten stellen ein Bindeglied zur Außenwelt und damit ein Risiko für einen Salmonelleneintrag bzw. die Salmonellenverbreitung dar (LIEBANA et al. 2003). GUARD-PETTER et. al (1997) und DAVIES und WRAY (1995) konnten zeigen, dass die Hausmaus die dominante Nager-Spezies in Hühnerställen und eine reichhaltige Quelle für organinvasive SE ist. In der Regel sind diese sowie Wildvögel, in deren Kot ebenfalls Salmonellen nachgewiesen werden konnten, persistent infiziert (DAVIES und WRAY 1995; DAVIES und WRAY 1996), d.h. können denn Erreger jahre- bis lebenslang mit dem Kot ausscheiden (DE KRUIF et al. 2006). Auch Insekten, für die die Umgebung der Ställe zu jeder Jahreszeit einen idealen Lebensraum darstellt, sind meist an der Salmonellenproblematik beteiligt. So haben WALES et al. (2010) bei zahlreichen Fliegenpopulationen in Ställen infizierter Herden Salmonellen nachgewiesen. Käfer und insbesondere Milben sollen ebenfalls als potentielle Salmonellenträger fungieren (MORO et al. 2007, WALES et al. 2010). RABSCH et al. (2007) konnten mit Hilfe der Analyse der klonalen Diversität von SE-Isolaten und deren Verbreitung in der ehemaligen DDR während der 1980er Jahre zeigen, dass Hühnerbestände die Erreger aus der Umwelt akquirieren, meist in der ersten Phase der Legeperiode (VAN DE GIESSEN et al. 1994).

Die Untersuchungen von DAVIES und WRAY (1996) zur Persistenz von Salmonellen in Ställen und deren Umgebung führten zu dem Ergebnis, dass der Erreger bis zu einem Jahr in leeren Ställen überleben kann und sich primär in Futter- und Staubpartikeln aufhält. Zudem wiesen sie nach, dass Salmonellen bis zu 26 Monaten in artifiziell kontaminiertem Futter überleben können (DAVIES und WRAY 1996).

Die Übertragung zwischen den Tieren kann vertikal oder horizontal aerogen oder durch direkten Kontakt zwischen den Tieren oder mit dem Kot infizierter Tiere stattfinden (LISTER 1988; EFSA 2010).

### **2.2.3 Salmonelleninfektion des Menschen**

Laut EFSA (2010) lag die Zahl der verifizierten humanen Salmonelleninfektionen in der EU im Jahre 2008 bei etwa 130.000 (58% davon durch SE verursacht). Diese Zahl spiegelt allerdings gemäß EFSA (2010) nicht einmal ein Siebtel der eigentlichen Fallzahl (mindestens 1 Million) wider, da nicht alle Menschen klinisch erkranken und die positiven Ergebnisse der Untersuchungseinrichtungen der Mitgliedstaaten vermutlich unter der eigentlichen Infektionsrate liegen. Mithilfe von Serosurveillance-Studien konnte gezeigt werden, dass weitaus mehr Menschen serologisch Salmonellen-positiv sind als von den Untersuchungseinrichtungen erfasst werden (EFSA 2010).

90% der lebensmittelbedingten Infektionen werden durch Salmonellen verursacht (BFR 2010). Welche Nahrungsmittel für die Salmonelleninfektionen verantwortlich sind, variiert zwischen den Ländern in Abhängigkeit von Ess- und Verarbeitungsgewohnheiten sowie der Prävalenz verschiedener Serovare in den verschiedenen Lebensmittelketten. Die tatsächliche Infektionsquelle ist meist schwer zu identifizieren, da es zu Kreuzkontaminationen kommen kann und die Nahrungsmittel oft aus vielen verschiedenen Bestandteilen zusammengesetzt sind (EFSA 2010). Der überwiegende Anteil der durch SE hervorgerufenen gemeldeten Lebensmittelinfektionen, laut EFSA (2004) 76%, wurde durch den Konsum von unzureichend gekochten Eiern, Eiprodukten oder Lebensmitteln, die rohe Eier enthalten (z.B. Speiseeis) verursacht (COWDEN et al. 1989; SOBEL et al. 2000; KIMURA et al. 2004; O'BRIAN et al. 2004; EFSA 2004; EFSA 2010). Neben dem Verzehr kontaminierter Eier stellt auch der Konsum von Fleisch ausgemerzter Legehennen und Broilerfleisch ein Risiko dar. Derzeit liegen keine Daten zur Risikoeinschätzung von Legehennenfleisch vor, da dieses als „Geflügelfleisch“ deklariert wird, d.h. nicht separat von z.B. Broilerfleisch begutachtet wird. Die höhere Salmonellen-Prävalenz in Legehennenbetrieben, das Alter der Tiere und die Wahrscheinlichkeit einer extra-intestinalen Salmonellenbesiedelung aufgrund des geschwächten Immunsystems am Ende der Legeperiode sprechen dafür, dass Legehennenfleisch ein höheres Risiko birgt als Broilerfleisch (EFSA 2010).

Infiziert sich ein Mensch mit nicht-wirtsspezifischen Salmonellen, so können diese lokalisierte Enterocolitiden mit Durchfall verschiedenen Grades verursachen, Nausea, Bauchschmerz, mildes Fieber und Schüttelfrost, Anorexie und Kopfschmerzen auslösen. Systemische Infektionen sind seltener und kommen vorwiegend bei sehr jungen, älteren oder immunsupprimierten Menschen vor. Problematisch sind Langzeitschäden wie das Reizdarmsyndrom, reaktive Arthritis und neurologische bzw. neuromuskuläre Erkrankungen (REES et



al. 2004; EFSA 2004). Die Inkubationszeit beträgt fünf Stunden bis sieben Tage und ist abhängig von der Infektionsdosis (EFSA 2004). Aufgrund der Relevanz dieser Infektion handelt es sich gemäß §§ 6, 7 Infektionsschutzgesetz um eine für den Menschen meldepflichtige Krankheit.

## **2.3 Rechtliche Grundlagen zur Legehennenhaltung**

Wie aufgezeigt (s. 2.2.1), stellte die Problematik der humanen Salmonellosen bis zur Jahrhundertwende ein ernsthaftes Risiko dar. Dies führte zum Erlass einiger rechtlicher Grundlagen der Salmonellen-Bekämpfung auf EU-Ebene sowie in der Konsequenz auf nationaler Ebene. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick gegeben werden.

### **2.3.1 EU-Ebene**

#### **2.3.1.1 Verordnung (EG) Nr. 2160/2003**

*vom 17. November 2003 zur Bekämpfung von Salmonellen und bestimmten anderen durch Lebensmittel übertragbaren Zoonoseerregern (Zoonosen-Bekämpfungs-VO)*

Die Zoonosen-Bekämpfungs-Verordnung (VO) wurde erlassen, um die bisherigen Bekämpfungsmaßnahmen gegen Zoonoseerreger in der gesamten Lebensmittelkette, vom Erzeuger bis zum Verbraucher, zu verbessern. Auf Basis epidemiologischer Daten sollten Ziele für die Senkung spezifischer Zoonosen- und Zoonosenerregerprävalenzen, darunter auch „alle Salmonellen-Serotypen von Belang für die öffentliche Gesundheit bei Legehennen“ (Anhang I), definiert werden. Um diese Ziele zu erreichen, wurden die Mitgliedstaaten der EU (MS) aufgefordert, Bekämpfungsprogramme auszuarbeiten. Diese mussten dann von der EU-Kommission geprüft und genehmigt werden. Im Anhang der VO sind allgemeine Anforderungen an die Bekämpfungsprogramme (u.a. das Ausmaß der Probennahmen) und spezielle Anforderungen an Legehennenherden (Verarbeitung von Produkten infizierter Legehennenherden) aufgeführt.

#### **2.3.1.2 Verordnung (EG) Nr. 1168/2006**

*vom 31. Juli 2006 zur Durchführung der VO 2160/2003 hinsichtlich eines Gemeinschaftsziels zur Eindämmung der Prävalenz bestimmter Salmonellen-Serotypen bei Legehennen der Spezies Gallus gallus und zur Änderung der VO (EG) Nr. 1003/2005*

Basierend auf den Ergebnissen der „Grundlagenstudie zur Prävalenz von Salmonellen in Legehennenbeständen“ (Entscheidung 2004/665/EG) wurde gemäß der Zoonosen-Bekämpfungs-VO als Gemeinschaftsziel zur Senkung der Salmonellen-Prävalenz die jährliche prozentuale Verringerung SE-/STM-positiver Herden erwachsener Legehennen wie folgt festgelegt:

um mindestens

- i) 10% im Falle einer Prävalenz von weniger als 10% im Vorjahr
- ii) 20% im Falle einer Prävalenz von mind. 10% und höchstens 19% im Vorjahr
- iii) 30% im Falle einer Prävalenz von mind. 20% und höchstens 39% im Vorjahr
- iv) 40% im Falle einer Prävalenz von mind. 40% im Vorjahr

oder eine Verringerung des Höchstprozentsatzes auf 2% oder weniger.

Der Beginn der Umsetzung des Gemeinschaftszieles wurde mit dem Jahre 2008 festgelegt. Ab diesem Zeitpunkt waren die MS über einen Zeitraum von drei Jahren dazu verpflichtet, die im Anhang der VO angeführten Untersuchungsverfahren durchzuführen und deren Ergebnisse an die Kommission weiterzuleiten. Anhand dieser Ergebnisse wurde die Einhaltung des Gemeinschaftsziels evaluiert. Wie in der Einleitung dargestellt, konnte das Gemeinschaftsziel im Bezug auf die Salmonellenprävalenz bei Legehennenherden im Jahre 2009 nicht eingehalten werden. Die Prävalenz nahm von 2,7% SE-/STM-positiver (davon SE-positiv: 2,4%) Legehennenherden 2008 auf 4,8% SE-/STM-positiver (davon SE-positiv: 4,5%) Legehennenherden 2009 zu. Die Ergebnisse für das Jahr 2010 liegen noch nicht vor (Stand: Dezember 2011).

#### **2.3.1.3 Verordnung (EG) Nr. 1177/2006**

*vom 1. August 2006 zur Durchführung der Verordnung (EG) Nr. 2160/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der Bestimmungen über die Anwendung von spezifischen Bekämpfungsmethoden im Rahmen der nationalen Programme zur Bekämpfung von Salmonellen bei Geflügel*

In dieser VO wurden die Konsequenzen der Ergebnisse zweier von der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (European Food Safety Authority-EFSA) verfassten Gutachten bzgl. antimikrobieller Wirkstoffe (EFSA 2005) und Impfstoffe (EFSA 2004) gegen Salmonellen umgesetzt.

Aufgrund der Gefahren für die Gesundheit der Bevölkerung, die mit der Entwicklung, Auswahl und Verbreitung von Antibiotika-Resistenzen verbunden sind, wurde die Verwendung von Antibiotika gegen Salmonellen nicht als spezifische Bekämpfungsmethode anerkannt, sondern es wurde entschieden, dass sie nur in definierten Ausnahmefällen einzusetzen ist.

Die Verwendung von Impfstoffen erkennt die EFSA als eine Maßnahme zur Verstärkung der Salmonellenresistenz der Tiere und zur Verringerung der Salmonellenausscheidung an. Impfstoffe dürfen nur verwendet werden, wenn eine Unterscheidung zum Wildstamm möglich ist und bei Legehennen während der Legeperiode nur dann, wenn mit Sicherheit nachgewiesen ist, dass sie keine Gefahr für den Menschen darstellen.

In allen MS mit einer Prävalenz von über 10% sind ab dem 01.01.2008 Impfprogramme mindestens in der Aufzuchtphase der Legehennen gegen SE durchzuführen.

### **2.3.2 Nationale Ebene**

#### **2.3.2.1 Verordnung zum Schutz gegen bestimmte Salmonellen-Infektionen beim Haushuhn (Hühner-Salmonellen-VO)**

*vom 06. April 2009*

Die Hühner-Salmonellen-VO setzt die von der EU vorgegebenen Rechtsgrundlagen zur Bekämpfung von Salmonellen in nationales Recht um.

Impfungen gegen SE bzw. STM können angeordnet werden, wenn dies aus Gründen der Tierseuchenbekämpfung erforderlich ist. Für Legehennen-Aufzuchtbetriebe mit mehr als 350 Tieren besteht grundsätzlich eine Impfpflicht gegen SE für Küken und Junghennen. Durchgeführte Impfungen müssen dokumentiert werden, die Aufzeichnungen sind aufzubewahren. Gegen STM muss im Falle des Verdachtes oder einer verifizierten Infektion im vorhergehenden Aufzuchtdurchgang, geimpft werden.

Generell ist in den Betrieben auf Hygiene zu achten, Reinigung und Desinfektion sind ordnungsgemäß durchzuführen. In Aufzucht- und Legehennenbetrieben sind betriebseigene Kontrollen vorgeschrieben, positive Ergebnisse für SE bzw. STM sind der zuständigen Behörde unverzüglich mitzuteilen und Untersuchungen zur Ermittlung der Infektionsursache sind durchzuführen. Mindestens eine Herde pro Betrieb und Jahr wird einer amtlichen Untersuchung unterzogen.

Liegt der Verdacht auf eine Infektion oder eine Infektion mit Salmonellen vor, dürfen die Hühner nicht verbracht werden, es sei denn, es handelt sich um diagnostische Zwecke bzw. die amtlich bewilligte Beförderung zur Schlachtung oder Tötung und unschädlichen Beseitigung. Die Eier dieser Legehennenbetriebe dürfen entsprechend nicht verbracht werden, es sei denn, es handelt sich um die Verbringung zu diagnostischen Zwecken, zur unschädlichen Beseitigung, als Klasse-B-Eier oder die Lieferung an zugelassene Verarbeitungsbetriebe für Eiprodukte.

Zudem sieht die VO jährliche Angaben der Länder über die vorherrschende Salmonellen-Prävalenz und die Übermittlung dieser Daten an das Bundesministerium vor, das diese dann an die Kommission der EU weiterleitet.

## **2.4 Die Salmonelleninfektion von Huhn und Ei**

### **2.4.1 Die intestinale Infektion**

Das Ausmaß einer Salmonelleninfektion, d.h. die bakterielle Besiedelung, die Organinvasivität und die Persistenz der Salmonellen beim Huhn ist von verschiedenen

Faktoren, wie der Infektionsdosis, der Serovar bzw. Biovar, dem Alter zum Zeitpunkt der Infektion und der Hühnerlinie abhängig (WALLIS 2005; THOMAS et al. 2009).

Salmonellen werden in der Regel oral von Hühnern aufgenommen und gelangen so in den Gastro-Intestinal-Trakt (GIT). Im Darm können sie für mehrere Wochen persistieren (SMITH und BEAL 2008) und die Darmwand, insbesondere lymphatisches Gewebe wie Peyersche Platten und caecale Tonsillen, besiedeln und in phagozytierende Zellen aufgenommen werden. Intrazellulär gelangen sie in den Blutkreislauf, d.h. überwinden die Blut-Darm-Schranke, erreichen innerhalb von 24-48 Stunden die inneren Organe wie Milz und Leber, wo sie sich vermehren können und die dann einen Ausgangspunkt für die weitere Dissemination darstellen (BARROW et al. 1987; ZHANG-BARBER et al. 1999; VAN IMMERSEEL et al. 2002b). Auf diese Weise ist auch die Besiedelung des Reproduktionstraktes möglich (OKAMURA et al. 2001; DE BUCK et al. 2004b), was durch die transiente Immunsuppression zu Beginn der Legeperiode, wie es WIGLEY et al. (2005) für *S. Gallinarum* biovar Pullorum und biovar Gallorum beschrieben haben, begünstigt wird.

Die Kloake als letzter Abschnitt des GIT und Verbindung zum Reproduktionstrakt stellt eine potentielle Lokalisation für die Kontamination der Eischale dar (RODRIGUE et al. 1990; BARROW und LOVELL 1991; KELLER et al. 1995). In der Regel kommt das Ei während der Eiablage allerdings nicht mit der Kloake in Berührung, da sich die Vagina in die Kloake nach Außen stülpt. Einige Autoren vermuten daher, dass die Kontamination der Eischale nicht in der Kloake stattfindet, sondern in den distalen Abschnitten des Ovidukts durch aus der Kloake aufsteigende Salmonellen oder erst nach der Eiablage. Letztendlich ist es schwierig, eine Kontamination der Eischale während der Eiablage von einer Kontamination in der Umwelt zu unterscheiden (DE BUCK et al. 2004b).

#### **2.4.2 Die Infektion des Ovars**

Die gute Durchblutung und die gesteigerte Permeabilität der Blutgefäße des Ovars (GRIFFIN et al. 1984) erleichtern den Übergang der Salmonellen vom Blut ins Gewebe (GANTOIS et al. 2009). THIAGARAJAN et al. (1996) konnten nachweisen, dass Salmonellen die Granulosazellen der ovariellen Follikel penetrieren und sich in ihnen vermehren (THIAGARAJAN et al. 1996). Von den Granulosazellen aus können die Salmonellen in präovulatorische Follikel verschiedener Stadien übergehen (THIAGARAJAN et al. 1994). Dabei ist die Membran präovulatorischer Follikel häufiger mit Salmonellen besiedelt als das Eigelb (GAST und HOLT 2001). Eine Invasion der nährstoffreichen Follikel würde vermutlich zu einer massiven Replikation der Salmonellen und damit zu einer Follikeldegradation führen. Da aber die Legerate bei natürlich infizierten Legehennen nicht reduziert ist, kommt der Kolonisierung der Follikel vermutlich keine besondere Bedeutung in der Eikontamination zu (GANTOIS et al. 2009).

### 2.4.3 Die Infektion des Oviduktes

Die Infektion des Oviduktes kann direkt über die Blutbahn, als absteigende Infektion vom Ovar oder als aufsteigende Infektion von der Vagina bzw. Kloake (BARROW und LOVELL 1991; MIYAMOTO et al. 1997) erfolgen (KELLER et al. 1995). In Abhängigkeit des infizierten Organabschnittes, können bestimmte Teile des Eies kontaminiert werden (GANTOIS et al. 2009). Da Salmonellen für die Drüsenzellen von Magnum und insbesondere Isthmus (DE BUCK et al. 2004a) eine besondere Affinität aufweisen, sind das Eiweiß und die Schalenmembranen am häufigsten kontaminiert (KELLER et al. 1995; GANTOIS et al. 2009; HOOP und POSPISCHIL 1993; DE BUCK et al. 2004a).

Salmonellen können im Gewebe des Oviduktes über einen langen Zeitraum persistieren und stellen so eine anhaltende Kontaminationsquelle für sich formierende Eier dar (DE BUCK et al. 2004b), auch wenn im GIT keine Salmonellen mehr nachzuweisen sind (BYGRAVE und GALLAGHER 1989). Immunsupprimierende Faktoren wie Stress, besondere hormonelle Situationen oder (Infektions-) Krankheiten können einen Wiedereintritt der Bakterien in das Lumen des Oviduktes und somit die Infektion von Eiern ermöglichen, was das intermittierende Auftreten kontaminierter Eier erklären würde (KELLER et al. 1995; DE BUCK et al. 2004b).

Die „*in-ovo*“-Kontamination durch natürliche Infektionen ist selten (DE BUCK et al. 2004b; HUMPHREY 2005). Dennoch ist nach Auffassung des EFSA-Gremiums die gesundheitliche Bedeutung der Salmonellen-Übertragung durch Eier, die intern mit SE kontaminiert sind, bedeutender als die durch extern kontaminierte Eier (EFSA 2004), da in intern kontaminierten Eiern hohe Infektionsdosen erreicht werden können (HUMPHREY 2005). Die Kontamination der Eischale ist sehr viel häufiger (BARROW und LOVELL 1991; FSA 2004; DAVIES und BRESLIN 2004; FSA 2007), u.a. weil eine große Anzahl von Salmonellen-Serovaren über die Fähigkeit verfügt, Kloake und GIT, jedoch nicht den Reproduktionstrakt und damit das Eiinnere zu besiedeln (DE BUCK et al. 2004b). KELLER et al. (1997) und GANTOIS et al. (2008b) zeigten, dass der Reproduktionstrakt der Hühner von SE und STM gleichermaßen besiedelt wird (KELLER et al. 1997; GAST et al. 2007; GANTOIS et al. 2008b), stärker als von anderen Serovaren (GANTOIS et al. 2008b). Dennoch ist SE die am häufigsten im Eiinneren nachgewiesene Serovar (GUARD PETTER 2010). SE scheint bei der Kolonisierung des Reproduktionstraktes bestimmte Stress-induzierte Faktoren zu exprimieren, die die Fähigkeit, dieses Organ zu besiedeln und in das Ei überzugehen, fördern (GANTOIS et al. 2008c; VAN IMMERSEEL 2010). GAST et al. (2003) bestätigten dies, indem sie nachwiesen, dass Tiere, die mit einem in Reproduktionsorganen *in vivo* passagierten und reisolierten SE-Stamm infiziert wurden, häufiger kontaminierte Eier aufwiesen, als Tiere, die mit *in vivo* passagierten und reisolierten SE-Stämmen aus anderen Organen infiziert wurden. Vermutlich ist die komplexe Regulation verschiedener

Virulenzfaktoren, die nicht unbedingt spezifisch für SE sind, für die besondere Fähigkeit der Eikontamination verantwortlich (GANTOIS et al. 2009). Dazu gehören die schon beschriebenen SEF 14 (TURCOTTE und WOODWARD 1993) und spezielle Lipopolysaccharide (LPS), die eine Rolle in der Persistenz des Erregers im Ovidukt und Ei, der Eikontamination sowie der Besiedelung von vaginalem Gewebe tragen (GUARD-PETTER 2001; MIZUMOTO et al. 2005; GANTOIS et al. 2009; VAN IMMERSEEL 2010). Gemäß LI et al. (2009) soll SE eine komplexe Immunreaktion im Ovidukt hervorrufen, die eine Langzeitbesiedelung des Organs ermöglicht (LI et al. 2009). In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass sich SE vor den antimikrobiellen Mechanismen des Eiweißes (Ovotransferrin, Lysozym) besser schützen kann als andere Serovare (LU et al. 2003; CLAVIJO et al. 2006; GANTOIS et al. 2008a). Die Identifikation der Mechanismen, die für die Eikontamination verantwortlich sind, ist für die Herstellung von Lebendimpfstoffen von Bedeutung, da diese derart modifiziert werden könnten, dass eine Infektion des Eies und damit die Übertragung auf den Menschen beim Konsum von Eiern geimpfter Hennen vermieden wird (VAN IMMERSEEL 2010).

#### **2.4.4 Die Infektion des Eies außerhalb des Hühnerkörpers**

In der Umwelt wird die Eischale in der Regel durch die Fäzes Salmonellen-ausscheidender Tiere kontaminiert. Hühnerkot und feuchtes organisches Material (z.B. Einstreu) stellen ein Nährstoffreservoir für Salmonellen dar und sichern damit deren Überleben (GANTOIS et al. 2009). Kurz nach der Eiablage, wenn die Temperatur des Eies noch dem des Hühnerkörpers (41-42 °C) entspricht, kann der durch die rapide Abkühlung des Eies entstehende Druckunterschied die Salmonellen vermutlich von der Eischale in das Eiinnere saugen und dieses kontaminieren (KELLER et al. 1995). Auch die Beschädigungen von Eischale bzw. Kutikula (VADEHRA et al. 1969; GAST et al. 2006; MESSENS et al. 2006), die Kontamination frisch gelegter Eier mit Fäzes (PADRON 1990; GAST et al. 2006; MESSENS et al. 2006) sowie die Bildung kondensierten Wassers auf der Eischale (MESSSENS et al. 2005) begünstigen die Passage der Salmonellen durch die Eischale und -membranen und das Vordringen in das Innere des Eies.

### **2.5 Das Immunsystem des Huhnes und die Reaktion auf Salmonellen**

Bis heute ist das aviäre Immunsystem in einigen Bereichen nur wenig erforscht (VAN IMMERSEEL et al. 2005). Es weist einige Parallelen zu dem Immunsystem der Säuger auf, einige Komponenten unterscheiden sich jedoch grundsätzlich.

Die humoralen und insbesondere zellulären Immunreaktionen von Mäusen auf die Infektion mit STM wurden sehr detailliert untersucht. Da STM bei Mäusen im Gegensatz zu SE bei

Hühnern eher eine typhöse Verlaufsform auslöst, können die Ergebnisse dieser Untersuchungen nur teilweise auf das aviäre Immunsystem übertragen werden (ZHANG-BARBER et al. 1999; VAN IMMERSEEL et al. 2005).

### **2.5.1 Die zellulär vermittelte Immunabwehr**

#### **2.5.1.1 Intestinal**

Das Darm-assoziierte-lymphoide Gewebe (gut-associated lymphoide tissue-GALT) stellt das Immunsystem des GIT dar und damit die initiale Abwehr bei der oralen Salmonelleninfektion. Direkt nach dem Schlupf ist das GALT morphologisch und immunologisch noch unreif. Die Futteraufnahme, die Exposition von Umwelt-Antigenen und die Entwicklung der enterischen Mikroflora stellen die essentiellen Stimuli für die morphologische Differenzierung (Zahl und Länge der Mikrovilli, Enterozytenzahl, Kryptentiefe) und immunologische Differenzierung des GIT dar (FRIEDMAN et al. 2003; SMITH und BEAL 2008). In aufeinanderfolgenden Phasen wandern Lymphozyten kurz nach dem Schlupf aus der *Bursa fabricii* (B-Lymphozyten) bzw. dem Thymus (T-Lymphozyten) zunächst in die Dickdarmwand, insbesondere in die Blinddarmwand ein, und wandern von dort aus auf systemischem Weg in den Dünndarm. Erst mit der Ausbildung der zellulären Komponente (T-Lymphozyten) des intestinalen Immunsystems kann auch eine humoral vermittelte Immunantwort stattfinden (BAR-SHIRA et al. 2003). Vier bis sechs Wochen nach dem Schlupf ist das enterische Immunsystem vollständig entwickelt (SMITH und BEAL 2008) und verfügt über die Zellzusammensetzung eines adulten Tieres und Immunzellen, die in der Lage sind, adäquat auf eine Immunstimulation zu reagieren (LILLEHOJ und CHUNG 1992; LOWENTHAL et al. 1994).

Das GALT setzt sich aus vielen lymphoiden Zellen im Darmepithel und der *Lamina propria* sowie spezialisierten Strukturen, die an strategisch wichtigen Bereichen, wie dem Meckelschen Divertikel, den Peyerschen-Platten und den Caecalen Tonsillen lokalisiert sind, zusammen. Im Unterschied zu Säugern besitzen Hühner keine formierten Lymphknoten, sondern lymphoide Aggregate, die sich entlang des Darmes befinden. Dazu gehören auch die sogenannten Mikrofolded Cells (M-Zellen), die im Epithel über Lymphozytenaggregaten lokalisiert sind und wie beim Säuger für die Aufnahme und den Weitertransport von sich im Darmlumen befindlichen Antigenen an die darunterliegenden Lymphozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen zuständig sind (KITTAGAWA et al. 2000). Das Epithel verfügt über hochspezialisierte Lymphozyten, den sogenannten intraepithelialen Lymphozyten, wobei es sich fast ausschließlich um T-Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK) handelt (GÖBEL et al. 2001). In der *Lamina propria* befinden sich Makrophagen (nehmen 2-4% der Darmwandfläche ein), Heterophile (2-7%), das Pendant zu den neutrophilen Granulozyten der Säuger (JUUL-MADSEN et al. 2008), T-Lymphozyten (1-4%) und in geringem Maße auch B-Lymphozyten (< 1%) (VAN IMMERSEEL et al. 2002b). Bei Kontakt mit einem

Pathogen können sich der Gehalt der Immunzellen und deren Verhältnis zueinander stark verändern (VAN IMMERSEEL et al. 2002b).

Nach der Aufnahme von Salmonellen wird die Darmwand zunächst massiv von Heterophilen, gefolgt von Makrophagen und T-Lymphozyten infiltriert (KOGUT et al. 1994; DESMIDT et al. 1997; HENDERSON et al. 1999; VAN IMMERSEEL et al. 2002b; VAN IMMERSEEL et al. 2002c). B-Lymphozyten wandern erst verzögert in die Darmwand ein und formieren sich zu Follikeln (VAN IMMERSEEL et al. 2002b). Einige Granulozyten passieren die Darmschranke und gelangen so in das intestinale Lumen (GALYOV et al. 1997; LEE et al. 2000) um luminale Salmonellen zu eliminieren.

#### **2.5.1.2 Systemisch**

Phagozyten haben eine große Bedeutung für die Verbreitung der Salmonellen. Sie stellen quasi den Schlüssel zur systemischen Infektion dar, sind aber andererseits wichtig für die Inaktivierung der Keime (BARROW et al. 1994). Salmonellen besitzen ein reichhaltiges Repertoire an Mechanismen, das Immunsystem des Wirtes zu umgehen bzw. zu verändern (JANTSCH et al. 2011). So verfügen intrazelluläre Salmonellen über einen rapiden und einen verzögerten Mechanismus, um eine Apoptose der Makrophagen auszulösen. Mithilfe der verzögerten Apoptose bleibt den Salmonellen bei einer systemischen Infektion ausreichend Zeit sich zu replizieren, die Zelle zu verlassen, andere Makrophagen zu befallen und sich auf diese Weise zu verbreiten (KNODLER und FINLAY 2011). Sie sind in der Lage, die für die Inaktivierung essentielle Verschmelzung von Phagosomen und Lysosomen in den Makrophagen zu verhindern (CHAPPELL et al. 2009), mithilfe von Katalasen den oxidativen Stress zu umgehen (SLAUCH 2011) und die Antigen (Ag)-Präsentation der Dendritischen Zellen zu reduzieren und damit die Ag-abhängige T-Zellproliferation und -aktivierung zu supprimieren (CHEMINAY et al. 2005).

Trotz der effektiven „escape“-Mechanismen der Salmonellen sind Phagozyten, insbesondere Heterophile, in der Lage, Salmonellen zu hemmen, was in verschiedenen *in vitro* Versuchen nachgewiesen wurde (STABLER et al. 1994; HENDERSON et al. 1999; KASPERS et al. 2000) und vermutlich durch eine intrazelluläre Eisenrestriktion der Phagozyten vermittelt wird (JANTSCH et al. 2011). Die bedeutende Rolle der Heterophilen in der Salmonellenabwehr *in vivo* wurde in einer Vielzahl von Studien nachgewiesen (KOGUT 2002; KOGUT et al. 2002; KOGUT et al. 2003; SWAGGERTY et al. 2003; SWAGGERTY et al. 2004). KOGUT et al. (1993) zeigten, dass Hühner, die unter einer Granulotzytopenie leiden, empfänglicher für eine Organinvasion mit SE sind, und dass der Grad des Heterophilenmangels proportional zur Bakterienzahl in den inneren Organen ist (KOGUT et al. 1993). FARNELL et al. (2001) applizierten Hühnern rekombiniertes Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), dessen stimulatorischer Effekt auf Phagozyten erwiesen ist, in die Bauchhöhle und konnten nach SE-Infektion eine im Vergleich zur Kontrollgruppe reduzierte Organinvasion nachweisen (FARNELL et al. 2001).



Neben der Aktivierung von Phagozyten deuten die gesteigerte Expression der mRNA für Interleukin (IL)-1 $\beta$ , Hühner-Interferon  $\gamma$  (*chicken*-Interferon  $\gamma$ -ChIFN $\gamma$ ) und IL-12 (SCHUETZE et al. 2005) in GIT, Leber und Milz auf eine Aktivierung der T-Lymphozyten (WITHANAGE et al. 2005; BEAL et al. 2005; VAN HEMERT et al. 2006; BERNDT et al. 2007; SMITH und BEAL 2008; CHAPPELL et al. 2009). Wie Säuger verfügen auch Hühner über T-Zellen mit CD4- oder CD8-Rezeptoren. Man nimmt an, dass sich analog zu den Säugerzellen CD4-Rezeptoren auf T-Helfer-Zellen (Th-Zellen) befinden und CD8-Rezeptoren auf zytotoxischen Zellen. Ob, wie beim Säuger, eine Differenzierung in Th1- und Th2-Zellen stattfindet, konnte noch nicht gänzlich geklärt werden. Man nimmt aber an, dass es zwei Richtungen der Immunantwort gibt: (i) eine mithilfe von Th1-Zellen primär zellvermittelte und (ii) eine eher von Antikörpern geprägte, durch Th2-Zellen induzierte Immunantwort (VANDAVEER et al. 2001; KAISER und STÄHELI 2008). Die Th1-Antwort wird von vielen Wissenschaftlern als die bedeutendere in der Salmonellen-Bekämpfung angesehen, insbesondere in Bezug auf die „Gewebe-Clearance“ (NAGARAJA und RAJASHEKARA 1999; VAN IMMERSEEL et al. 2005). Bei Mäusen ist die entscheidende Rolle der Th1-Antwort bei Salmonellen-Primär-Infektionen bereits erwiesen (HESS et al. 1996; MASTROENI et al. 2000; VAN IMMERSEEL et al. 2005). METHNER und BERNDT (2000) schließen aufgrund der Fähigkeit der Salmonellen, intrazellulär, insbesondere in Makrophagen überleben zu können, auf eine besondere Bedeutung der zellvermittelten Immunantwort (cellular-mediated immunresponse-CMI) bei der Salmonellen-Abwehr. Sie zeigten, dass die zelluläre Immunantwort vor allem durch CD8-Zellen vermittelt wird (METHNER und BERNDT 2000; BERNDT und METHNER 2001). Entsprechend führten die Hühnerversuche von BEAL et al. (2004b, 2005) und LEE et al. (1983) bei Salmonellen-Primärinfektionen zu einer starken CMI.

BEAL et al. (2004a,b) und WITHANAGE et al. (2005) wiesen in ihren Rechallenge-Versuchen eine massive und rapide Immigration von Immunzellen in den Darm nach, was eine Reduktion der Infektion auf den GIT ermöglicht. SMITH und BEAL (2008) konnten ebenfalls zeigen, dass sekundäre Salmonellen-Infektionen sehr viel schneller als Primärinfektionen überwunden werden. Diese Ergebnisse legen die Annahme der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses nahe.

## **2.5.2 Die humoral vermittelte Immunabwehr**

### **2.5.2.1 Intestinal**

Wie beschrieben befinden sich nur wenige B-Zellen in der Darmwand von Hühnervögeln. Diese sind vorwiegend in der *Lamina propria* lokalisiert und haben meist einen Immunglobulin(Ig)-Klassen-Wechsel hinter sich, d.h. sie sezernieren ausschließlich sekretorische Antikörper (Ak) vom Ig-Isotyp A (IgA) (SMITH und BEAL 2008). Aufgrund des luminalen Vorkommens der Salmonellen stellt die IgA-Abwehr einen wichtigen ersten

intestinalen Abwehrmechanismus dar (DESMIDT et al. 1998; VAN IMMERSEEL et al. 2005). Sekretorische IgA (SIgA) binden die Enteropathogene und verhindern so eine Anheftung und Kolonisierung der Darmwand (MUIR et al. 2000; FUKUTOME et al. 2001).

Entsprechend der zellulären Komponente der Immunabwehr benötigt die humorale eine gewisse Zeit zur Reifung. BEAL et al. (2004a) infizierten ein, drei und sechs Wochen alte Tiere und zeigten, dass die älteren Tiere mit einer schnelleren und höheren Ak-Reaktion auf die Salmonellen reagierten als die jüngeren Tiere (BEAL et al. 2004a). Die Reifung der B-Zellen findet vorwiegend in der *Bursa fabricii* statt, die eine einmalige Mikroumwelt für die Proliferation und Differenzierung der B-Zellen darstellt.

#### **2.5.2.2 Systemisch**

Entsprechend der IgA im GIT sind die Titer der im Blut zirkulierenden Immunglobuline vom M- und Y-Isotyp (IgM und IgY) nach einer Salmonelleninfektion erhöht (ZHANG-BARBER et al. 1999; WITHANAGE et al. 2005; BEAL et al. 2005), und korrelieren positiv mit dem Keimgehalt des Inokulums (CHART et al. 1990; BARROW 1992). Die aviären IgY weisen Homologien zu den IgG und IgE der Säuger auf, sie sind vermutlich phylogenetische Vorgänger dieser beiden Ig-Isotypen (DAVISON et al. 2008). DESMIDT et al. (1998) wiesen zwei Wochen nach der Infektion von vier Wochen alten Küken mit SE einen maximalen Gehalt aller Ig-Isotypen nach. Die Rolle der B-Zellen und Ak in der Salmonellenabwehr konnte allerdings bis heute noch nicht vollständig geklärt werden.

Für die Erforschung des Verhaltens und der Aufgaben der aviären B-Zellen, wurden Hühner experimentellen Bursektomien unterzogen. PARAMITHIOTIS und RATCLIFFE (1993) konnten mithilfe dieser Methode zeigen, dass die periphere B-Zellpopulation in drei Subpopulationen eingeteilt werden kann. Die erste Subpopulation, die ca. 60% der gesamten peripheren B-Zell-Population umfasst, stammt aus dem bursalen Cortex, hatte noch keinen Antigenkontakt und ist mit einer Halbwertszeit (HWZ) von 30 Stunden nur kurzlebig. Sie wird kontinuierlich durch B-Zellen aus der Bursa ersetzt. Die B-Zellen der zweiten Subpopulation umfassen ca. 35% der peripheren B-Zell-Population. Sie sind längerlebig (HWZ ca. drei Wochen), teilen sich nicht mehr und hatten daher vermutlich in der bursalen Medulla bereits Antigenkontakt. Die dritte Subpopulation (ca. 5% der gesamten B-Zell-Population) besteht aus kurzlebigen B-Zellen, die sich vermutlich aus sich schnellteilenden extra-bursalen Stammzellen differenziert haben. Diese sollen sich insbesondere in der Milz und im GALT aufhalten, vermehren und nach der Involution der Bursa um den sechsten Lebensmonat als B-Zell-Quelle dienen.

Für die Untersuchungen zur Rolle der B-Zellen speziell in der Salmonellenabwehr wurden Hühner zunächst bursektomiert, das heißt eine B-Zell-Depletion verursacht, und anschließend mit Salmonellen infiziert. Die bursektomierten Tiere unterschieden sich von den unbehandelten Kontrolltieren darin, dass der Antikörpertiter nach der Infektion nicht anstieg

und die B-Zell-Zahl stark reduziert war (ARNOLD und HOLT 1995; DESMIDT et al. 1998; BEAL et al. 2006a). Der Befall von Leber und Milz sowie die Abnahme der Salmonellenzahlen zwei bis vier Wochen nach der Infektion waren für die bursektomierten Tiere und die Kontrollgruppe identisch (ARNOLD und HOLT 1995; DESMIDT et al. 1998). Eine Salmonellen-Clearance findet demnach trotz Depression der humoralen Abwehr statt. BEAL et al. (2006a) postulieren daher, dass weder Antikörper noch B-Zellen für die Salmonellenbekämpfung notwendig sind, sondern dass ein „Non-B-Zell-Kompartement“ existiert, das für die Salmonellenabwehr verantwortlich ist. Welche Funktion dabei die bezeichneten B-Zellen extrabursalen Ursprungs haben, ist noch zu klären.

Die Identifizierung und Aufklärung der humoralen und zellulären Abwehrmechanismen stellen einen wichtigen Schritt in der Entwicklung von Vakzinen dar (BEAL et al. 2006a). Erwiesen ist, dass die initiale lokale Salmonellenabwehr im GIT sowohl auf zellulärer als auch auf humoraler Ebene von besonderer Bedeutung ist (DESMIDT et al. 1998; VAN IMMERSEEL et al. 2005). Bei systemischen Infektionen dominiert die zelluläre Immunantwort, insbesondere weil sich die Salmonellen zu Beginn der Infektion vorwiegend im intrazellulären Raum aufhalten, d.h. von der zellulären, aber nicht von der humoralen Abwehr erreicht werden können (DESMIDT et al. 1998; EFSA 2010).

### **2.5.3 Einflüsse auf die Immunabwehr**

Die Immunabwehr der Hühner wird von deren Alter zum Zeitpunkt der Infektion (BEAL et al. 2004a) sowie von der genetischen Veranlagung der Tiere (BEAL et al. 2005) zum Teil stark beeinflusst.

Wie dargestellt (s. 2.5), muss sich das Immunsystem des Hühnerküken erst entwickeln, d.h. adulte Tiere können eine Salmonelleninfektion leichter und schneller abwehren als jüngere Tiere. GAST und BEARD (1989) führten Infektionen mit STM zu den Zeitpunkten ein und acht Tage nach dem Schlupf durch und stellten fest, dass die jüngeren Tiere eine signifikant höhere Mortalität aufwiesen als die sieben Tage älteren Tiere. Eine ausgeprägte klinische Symptomatik zeigen nur Küken, die vor dem dritten Lebenstag infiziert werden (SMITH und BEAL 2008). Adulte Tiere erkranken in der Regel nicht, selbst wenn sie mit hohen Dosen ( $1,0 \times 10^7$  -  $1,0 \times 10^8$  KbE) oral infiziert werden und eine Bakteriämie mit extensiver systemischer Verbreitung vorliegt (EFSA 2010) (s. 2.1.3). Mit zunehmendem Alter, bzw. mit der Entwicklung des Immunsystems und einer normalen gastrointestinalen Mikroflora, begrenzt sich die Infektion hauptsächlich auf den Darm (BEAL et al. 2004b; EFSA 2010). Jüngere Tiere erweisen sich auch bei einer Reinfektion als empfindlicher (BEAL et al. 2004a).

Genetisch bedingte Unterschiede in der Resistenz verschiedener Hühner- bzw. Broilerlinien gegen Salmonellen konnte in verschiedenen Experimenten belegt werden. So konnten Variationen in der Interleukin1 $\beta$ -Produktion (BEAL et al. 2005), in der Aktivität der

Heterophilen (SWAGGERTY et al. 2003) und der Makrophagen (WIGLEY 2004; WIGLEY et al. 2005) nachgewiesen werden. In einer Studie von KINDE et al. (2000) wiesen braune Legelinien nach einer Salmonelleninfektion stärker besiedelte Organe und pathologische Läsionen auf als weiße Legelinien.

## **2.6 Bekämpfungsmaßnahmen gegen die Salmonelleninfektion**

Da es sich bei *Salmonella* um einen sehr vielseitigen und anpassungsfähigen Keim handelt (s. 2.1.1), sind Bekämpfungsmaßnahmen auf den verschiedenen Ebenen der Lebensmittelproduktion gemäß dem Konzept „from stable to table“ der Federation of Veterinarians of Europe (FVE) von großer Bedeutung (WALES et al. 2007).

### **2.6.1 Hygiene**

Wie beschrieben (s. 2.2.2) ist die persistierende Verseuchung der Bestände bzw. deren Umwelt (Nager, Staub, Insekten, Futter) das dominierende Problem (VAN DE GIESSEN et al. 1994; DAVIES und BRESLIN 2003a; GRADEL et al. 2004). Die unzureichende Bekämpfung von lebenden Vektoren, insbesondere von Mäusen (s. 2.2.2) sowie eine unzureichende Reinigung und Desinfektion gehören zu den häufigsten Ursachen einer Salmonellenpersistenz bzw. eines –wiedereintrages in die Bestände (DAVIES und WRAY 1996; DAVIES und BRESLIN 2003b). Daher stellt bereits die adäquate bauliche Gestaltung der Geflügelbetriebe, die eine ordnungsgemäße Reinigung und Desinfektion sowie Entwesung zulässt, eine wichtige Maßnahme zur Salmonellenbekämpfung dar. Mithilfe von Probenentnahmen kann der Erfolg von Reinigung und Desinfektion kontrolliert werden (EFSA 2004) und die Übertragung der Salmonellen von einem Produktionszyklus auf den nächsten vermieden werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die am längsten besetzten Ställe während eines Produktionszyklus am stärksten kontaminiert sind. Eine Verkürzung des Produktionszeitraumes ist daher sinnvoll (WALES et al. 2007).

Ein weiterer wichtiger Aspekt im Kampf gegen Salmonellen ist die Futterhygiene. In fast jedem Futterbestandteil können Salmonellen überleben (HAFEZ 2001), weshalb verschiedene Strategien wie Erhitzung (EFSA 2004) und die Zugabe verschiedener Säuren (HUMPHREY und LANNING 1988; HINTON und LINTON 1988; VAN IMMERSEEL et al. 2002a)) entwickelt wurden, um das Salmonellenrisiko im Futter zu reduzieren.

### **2.6.2 Impfung und Adjuvantien**

#### **2.6.2.1 Salmonellenimpfstoffe**

Die Impfstoffentwicklung setzt die genaue Kenntnis des Ablaufs der Infektion sowie der Reaktion des Immunsystems auf das betreffende Pathogen voraus (s. 2.5.2.2). Da derzeit weder das eine noch das andere für Salmonellen ausreichend geklärt ist, basiert der

Impfschutz gegen Salmonellen bis heute auf empirischen Grundlagen (EFSA 2004; WITHANAGE et al. 2005).

In der folgenden Tabelle 1 sind die Anforderungen an Salmonellenimpfstoffe sowie deren Begründungen aufgelistet.

Tab. 1 **Anforderungen an Salmonellenimpfstoffe** mit Begründungen.

Anforderung	Begründung	Referenz
Ausreichende Schutzwirkung vor intestinaler und systemischer Salmonelleninfektion	(i) Reduzierte Ausscheidung und damit reduzierte Kontamination von Umwelt und Eiern (ii) Reduktion der Gefahr von infiziertem Hühnerfleisch	EFSA 2004; VAN IMMERSEEL et al. 2005
Ausreichende Attenuierung des Impfstammes	(i) Ausschluss eines Risikos für Mensch und Tier (ii) Keine Persistenz in der Umwelt	CURTISS et al. 1993; BARBEZANGE et al. 2000b
Induktion eines weitestgehend natürlichen Infektionsverlaufs durch den Impfstamm (ausreichende Antigenität und Invasivität sowie Persistenz im Impfling)	Ausreichende Stimulierung des Immunsystems und Induktion einer optimalen Immunantwort	SPRENG et al. 2006 ; VAN IMMERSEEL et al. 2005
Elimination der MLV vor Beginn der Legeperiode	Kein Übergang der MLV in die Eier und Übertragung auf den Menschen	BARROW 2007
Unterscheidungsmöglichkeit von Impfstamm und Wildstamm	Vermeidung eines falsch-positiven Salmonellennachweises nach einer Impfung	VO (EG) Nr. 1177/2006
Einfache, kostengünstige und tiergerechte Anwendung	Keine Nachteile für Hühnerhalter und Hühner durch die Impfung	EFSA 2004; VAN IMMERSEEL et al. 2005; BARROW 2007; EFSA 2010
Kompatibilität mit anderen Kontrollmaßnahmen	Keine Behinderung anderer Bekämpfungsmaßnahmen (Anwendung von Competitive Exclusion-Kulturen, Prä-/Probiotika)	EFSA 2010

Kreuzimmune Impfstoffe haben den Vorteil, vor den beiden relevanten Serovaren STM und SE zu schützen. Die Kreuzimmunität zwischen Salmonellen zwei verschiedener Serogruppen (SE=Gruppe D, STM=Gruppe B) wird diskutiert, ist aber vermutlich geringer ausgeprägt als innerhalb einer Serogruppe (BARROW et al. 1991; FEBERWEE et al. 2001). Verschiedene Studien demonstrierten den von lebenden STM-Impfstämmen induzierten Impfschutz vor einer Infektion mit SE (HASSAN und CURTISS, III 1994; HASSAN und CURTISS 1997; GANTOIS et al. 2006; BEAL et al. 2006b). SPRINGER et al. (2011) impften Hühner mit einem lebenden SE-Impfstamm und konnten entsprechende Impferfolge gegen homologe und heterologe Infektionsstämme verzeichnen (SPRINGER et al. 2011). Im Gegensatz dazu konnten PARKER et al. (2001) mit dem von ihnen verwendeten STM-Impfstamm einen nur schwachen Impfschutz vor SE induzieren. Insbesondere die

Besiedelung des Reproduktionstraktes und die Eikontamination konnten durch die Impfung nicht verhindert werden (PARKER et al. 2001).

Der Vergleich von Impfstoffen bzw. der Vergleich der Untersuchungen von Impfstoffen ist schwierig, da die Effizienz von Impfstoffen sehr variabel sein kann in Abhängigkeit von

- (i) dem Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Impfung OKAMURA et al. (2004)
- (ii) dem Applikationsweg
- (iii) der Infektionsdosis und Virulenz des in der Untersuchung verwendeten Infektionsstammes
- (iv) den Parametern, mit welchen die Impfstoffeffizienz beurteilt wird (Organbesiedelung, Ausscheidung, Eikontamination)
- (v) dem Zeitraum zwischen Impfung und Infektion, da der Impfstamm bis zu sechs Wochen im Tier persistieren kann (METHNER et al. 1999)
- (vi) der verwendeten Hühnerlinie, da verschiedene Hühnerlinien wie bereits erwähnt unterschiedlich auf die Salmonellenimpfung reagieren (WIGLEY 2004; EFSA 2004; VAN IMMERSEEL et al. 2005)

Zurzeit sind in Deutschland zwei Lebendimpfstoffe und drei Inaktivimpfstoffe für Hühner gegen SE zugelassen und verfügbar. Im Folgenden werden die Vor- und Nachteile dieser Impfstoffpräparationen diskutiert.

#### **2.6.2.2 Lebendimpfstoffe**

In den letzten Jahren wurden zahlreiche SE-Lebendimpfstoffe für Hühner basierend auf verschiedenen Ansätzen und Methoden entwickelt und getestet. Nur wenige davon sind in Deutschland verfügbar und zugelassen.

In Anbetracht der bestehenden Kreuzimmunität zwischen Salmonellen innerhalb einer Serogruppe konnten mit durch Gendeletion attenuierten rauen *S. Gallorum* 9R-Vakzinen in verschiedenen Studien Erfolge im Schutz vor SE-Infektionen verzeichnet werden (BARROW et al. 1991; FEBERWEE et al. 2001; PENHA et al. 2010). Vorteil dieser Vakzine ist, dass sie kein Risiko für den Menschen darstellt, da SG wirtsspezifisch (s. 2.1.2) und damit ausschließlich hühnerpathogen ist (PENHA et al. 2010). Derzeit ist eine entsprechende Vakzine in Deutschland jedoch nicht verfügbar. Eine Impfung gegen SG ist laut Hühner-Salmonellen-VO nicht erlaubt.

Andere Impfstoffe basieren auf der Modifizierung von Genen derselben Serovar, die für metabolische Funktionen oder Virulenzfaktoren verantwortlich sind, ohne dass die Immunogenität beeinträchtigt wird. LINDE et al. (1998) beschrieben das Prinzip der „metabolischen Drift-Mutation“. Dabei handelt es sich um Minus-Mutationen in essentiellen Enzymen und Stoffwechselschaltzentralen der Salmonellen, die zu verlängerten Generationszeiten und folglich zu einer Virulenzminderung führen können (HAHN 1999). Eine Alternative stellen „auxotrophe Doppel-Marker-Mutanten“ dar, die durch chemische

Mutagenese erzeugt werden (MEYER et al. 1993; SPRINGER et al. 2000). Auxotrophe *aro* A-Mutanten, die nicht in der Lage sind, bestimmte essentielle aromatische Komponenten zu synthetisieren (GAST 2007), wurden als Impfstämme eingesetzt und als effektiv bewertet. Eine Kreuzimmunität konnte allerdings nicht hervorgerufen werden (COOPER et al. 1990; BARROW et al. 1990a; COOPER et al. 1994; PARKER et al. 2001). HASSAN und CURTISS (1994,1997) verwendeten modifizierte  $\Delta cya\text{-}\Delta crp$  STM-Doppelmutanten, die Deletionen in den Genen der Adenylatzyklase und dem Adenosinmonophosphat-Rezeptorprotein aufweisen (GAST 2007), und erreichten damit einen langfristigen Schutz vor SE und STM (HASSAN und CURTISS, III 1994; HASSAN und CURTISS 1997). METHNER et al. (2004) führten Studien mit Doppel- bzw. Dreifach-Mutanten durch, die sicherer sein sollen, da das Risiko für eine Reversion durch die Aufnahme von Wildstamm-Genen mittels horizontalem Gen-Transfer reduziert ist (HAHN 1999; VAN IMMERSEEL et al. 2005).

Auch Temperatur-sensitive spontane SE-Mutanten, die sich bei 26-28 °C vermehren, aber nicht bei 42 °C Körpertemperatur des Geflügels, wurden als Impfstoffstämme verwendet und getestet (CERQUETTI und GHERARDI 2000a, CERQUETTI und GHERARDI 2000b). CERQUETTI und GHERARDI (2000b) konnten mit diesen Lebendimpfstämmen Erfolge in der Reduktion der Organbesiedelung und fäkalen Ausscheidung verzeichnen.

Die meisten Mutationen der auf diese Weise entwickelten und heute zugelassenen und verwendeten Impfstoffe sind undefiniert und inkomplett charakterisiert, d.h. es ist ungewiss, welche Prozesse im Detail beeinflusst werden (EFSA 2004; VAN IMMERSEEL et al. 2005). Da die Genome von SE und STM inzwischen vollständig sequenziert sind und bestimmte an der Pathogenese beteiligten Gene bzw. „Housekeeping“-Gene, d.h. konstitutiv exprimierte Gene, identifiziert werden konnten, wurde die Entwicklung von „rationalen Impf-Mutanten“, d.h. durch gerichtete Genmutation bzw. -deletion veränderte Mutanten, ermöglicht (BARROW 2007).

Problematisch ist die Anwendung von modifizierter Lebendvakzinen (modified live vaccines-MLV) aufgrund der möglichen Ausbreitung und des Überlebens lebender Impforanismen in der Umwelt (PAPEZOVA et al. 2007) und der Gefahr des Wiedererlangens virulenter Eigenschaften dieser Impforanismen durch horizontalen Gentransfer (OKAMURA et al. 2003). So konnten BARBEZANGE et al. (2000) bei zwei von drei untersuchten zugelassenen MLV eine genetische Instabilität nachweisen (BARBEZANGE et al. 2000). Seit dem im Jahr 2000 vom Robert Koch-Institut, Berlin, etablierten Überwachungssystem für lebende SE- und STM-Impfstofforganismen in der humanen Population, konnten jedoch bei mehreren Tausend isolierten Salmonellen-Isolaten von infizierten Menschen keine Impfstoffmarker gefunden werden (RABSCH et al. 2001). Bisher scheint eine Reversion zu virulenten Eigenschaften und eine Übertragung auf den Menschen nicht stattgefunden zu haben (EFSA 2004).

Weitere Bedenken stellen die antimikrobiellen Resistenzen, die im Genom mancher Impfstämme kodiert sind sowie die Selektion von Salmonellen-Stämmen, vor welchen die Impfung keinen Schutz bietet dar (EFSA 2010).

Die Wirkung verschiedener MLV wurde in zahlreichen Versuchen nachgewiesen (COOPER et al. 1990; BARROW et al. 1991; CURTISS et al. 1993; COOPER et al. 1994; CURTISS und HASSAN 1996; SPRINGER et al. 2000; CERQUETTI und GHERARDI 2000a; FEBERWEE et al. 2001). Viele Autoren beurteilen sie im Vergleich zu Inaktivatvakzinen (killed vaccine-KV) als die wirkungsvollere Variante, da durch sie sowohl die humorale, als auch die zelluläre Immunantwort stimuliert werden (CURTISS et al. 1993; SPRINGER et al. 2000; LILLEHOY et al. 2000; VAN IMMERSEEL et al. 2005) und eine Langzeitimmunität von bis zu elf Monaten induziert werden kann (HASSAN und CURTISS 1997). BERNDT und METHNER (2001) verglichen die Infektion mit einem nicht-attenuierten Salmonellen-Wildstamm und die Impfung mit einem attenuierten Impfstamm und konnten zeigen, dass die für die Salmonellen-Clearance bedeutende T-Zell-Reaktion, insbesondere der CD8-T-Zellen, nahezu identisch war. BABU et al. (2003) verwendeten für ihren Versuch Tiere im Alter von 18 und 32 Lebenswochen (LW), die mit einer MLV oder KV geimpft worden waren, und wiesen bei ersteren einen CD4-T-Zell-Anstieg sowie aktivierte Splenozyten nach. Die mit einer KV geimpften Tiere reagierten mit einer weniger effektiven Immunantwort (BABU et al. 2003). Die Bedeutung von CD4-Zellen für die Produktion von Makrophagen-aktivierenden Faktoren und den Schutz vor intrazellulären Pathogenen bei Mäusen gilt als erwiesen (MCSORLEY et al. 2000).

CARVAJAL et al. (2008) demonstrierten, dass Salmonellenimpfstämme wie Salmonellenwildstämme auch die tieferen Schichten der Darmwand besiedeln, was maßgebend für den Grad der Immunreaktion ist (BERNDT et al. 2007). Die Korrelation zwischen der IgA-Produktion und dem Ausmaß der Caecumwandbesiedelung sowie der Persistenz des Impfstammes in der Caecumwand ist erwiesen (METHNER et al. 1999). Weiterhin kamen CARVAJAL et al. (2008) zu dem Ergebnis, dass ein homologer Challenge-Wildstamm bei mit MLV geimpften Tieren nicht in der Lage ist, in die tieferen Schichten der Darmwand vorzudringen. Eine Ursache dafür ist vermutlich die spezifische intramukosale Immunabwehr, im Speziellen der vom Impfstamm induzierte gesteigerte IgA- und CD8-Gehalt (CARVAJAL et al. 2008).

Einen weiteren Vorteil der MLV im Vergleich zu KV stellt der „Kolonisierungs-Inhibitionseffekt“ dar. Dabei handelt es sich um die intestinale Kolonisierung des Impfstammes bei frischgeschlüpften Küken, deren autochtone Flora sich noch nicht ausgebildet hat, und dem damit einhergehenden kompetitiven Inhibitionseffekt, insbesondere auf isogene Salmonellen. Dieser bietet innerhalb weniger Stunden einen frühen Schutz vor der Besiedelung von Blinddarm, Leber und Milz der sehr jungen und aufgrund des noch



unreifen Immunsystems hoch-empfindlichen Hühner (METHNER et al. 1997; VAN IMMERSEEL et al. 2002c; VAN IMMERSEEL et al. 2005).

In den letzten Jahren wurden verschiedene neue Technologien wie „Antigen-Delivery-Systeme“ (Mikrosphären, Liposomen, Immune stimulating complexes (ISCOMs) und Plasmid-DNA-Vektoren) (MUIR et al. 2000) und rekombinante Salmonellenimpfstoffe (*Salmonella* spp. als Vektor von Antigenen anderer Erreger) (CURTISS und HASSAN 1996; DARJI et al. 1997; ROLAND et al. 1999) entwickelt, die die Wirtsreaktion auf die Impfung verbessern sollen (SPRENG et al. 2006). Diese Fortschritte könnten auch in der Geflügelpraxis genutzt werden.

### **2.6.2.3 Inaktivatimpfstoffe**

Die meisten KV werden auf Basis der Eisen-Restriktion hergestellt. Die Eisenrestriktion kann in pathogenen Bakterien Virulenzgene bzw. die Synthese antigener Proteine, die nützliche Komponenten für die Impfstoffherstellung sein können, induzieren (FERREIROS et al. 1994; CLIFTON-HADLEY et al. 2002; KLITGAARD et al. 2010). Da die Expression dieser Gene in den Makrophagen, in welchen sich die Salmonellen primär aufhalten, nicht hochreguliert wird (ERIKSSON et al. 2003), ist die Relevanz dieser Virulenzgene bei Salmolnelleninfektionen und damit die genannte Methode fraglich (VAN IMMERSEEL et al. 2005). Im Gegensatz zu MLV besitzen KV bzw. Subunit-Vakzine *in vivo* nur die Antigene, die auch *in vitro* bei der Herstellung vorhanden sind. Bis heute konnten die Major-Immunogene der Salmonellen allerdings noch nicht identifiziert werden (VAN IMMERSEEL et al. 2005).

KV bieten einen gewissen Schutz vor der Ausscheidung, Organbesiedelung und Eikontamination (MIYAMOTO et al. 1999; LIU et al. 2001; CLIFTON-HADLEY et al. 2002; WOODWARD et al. 2002; BABU et al. 2003; OKAMURA et al. 2007; PIAO et al. 2007). Dieser Schutz ist allerdings nicht so hoch wie der durch einen MLV hervorgerufene Impfschutz (BARROW et al. 1990b; PAPEZOVA et al. 2007). KV regen primär die Antikörperproduktion an (VAN IMMERSEEL et al. 2005), nicht aber die zelluläre Immunantwort (CURTISS et al. 1993; CLIFTON-HADLEY et al. 2002) wie z.B. zytotoxische T-Zellen (BARROW et al. 1991; NAGARAJA und RAJASHEKARA 1999). Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass die Antikörperproduktion nach KV-Vakzinierung höher ist als nach MLV-Vakzinierung (SILVA et al. 1981; NASSAR et al. 1994; BABU et al. 2004; PAPEZOVA et al. 2007). Allerdings korreliert der Antikörperspiegel im Blut weder mit dem Schutz der Tiere (NASSAR et al. 1994) noch der Zahl kontaminierter Eier (GANTOIS et al. 2006). Wie beschrieben (s. 2.5.2) ist die Rolle der humoralen Immunantwort in der Salmonellenabwehr bis auf die IgA-Produktion im GIT fraglich (BEAL und SMITH 2007).

Um die Wirkung von Impfstoffen (MLV und KV) zu steigern, können sie mit bestimmten Cytokinen kombiniert werden, die das Ausmaß und die Qualität der Immunreaktion verbessern, die mukosale Immunantwort anregen (MUIR et al. 2000) und die Zahl und

Aktivität von Heterophilen steigern (KOGUT et al. 1994). TAKEHARA et al. (2003) applizierten sieben Wochen alten Hühnern, d.h. immunologisch reifen Tieren, ChIFN $\gamma$  in Kombination mit einem SE-KV intramuskulär und fanden zwar keine gesteigerte Antikörperproduktion, aber dennoch eine reduzierte intestinale Salmonellenbesiedelung. Diese wurde vermutlich durch die immunstimulatorische Wirkung des ChIFN $\gamma$  auf die zell-vermittelte Immunantwort hervorgerufen (TAKEHARA et al. 2003). MEENAKSHI et al. (1999) und FADL et al. (2002) konnten entsprechend mit der subkutanen Applikation von Adjuvantien (MEENAKSHI et al. 1999) und einer Subunit-Vakzine aus „Outer-Membrane-Proteinen“, die eine bedeutende Rolle bei der Anheftung der Salmonellen an die intestinalen Epithelzellen tragen (FADL et al. 2002), einen guten Immunschutz induzieren (MEENAKSHI et al. 1999).

Aus den genannten Gründen (s. 2.6.2.1) sind die Ergebnisse der KV-Studien teilweise nur bedingt vergleichbar. Den Versuchen liegen verschiedene Challenge-Methoden zugrunde, je nach Studie wurden die Tiere (i) intravenös (LIU et al. 2001; WOODWARD et al. 2002; OKAMURA et al. 2007), (ii) intraperitoneal (OKAMURA et al. 2007), (iii) intramuskulär (LIU et al. 2001) oder (iv) intravaginal (MIYAMOTO et al. 1999) infiziert. Die Relevanz dieser Infektionsmethoden ist fraglich, da eine natürliche Salmonelleninfektion in der Regel oral, nur ausnahmsweise kloakal stattfindet. Das Alter der Versuchstiere zum Zeitpunkt der Impfung variiert zum Teil sehr.

Einen Vorteil der gesteigerten Antikörperbildung nach der Impfung mit einer KV bietet die Übertragung der Antikörper auf die Nachkommen. METHNER et al. (1994, 1997b, 2002) konnten bei frischgeschlüpften Küken geimpfter Elterntiere (MLV und KV) einen erhöhten Gehalt maternaler Antikörper im Serum und Jejunum nachweisen sowie nach der Infektion mit Salmonellen eine reduzierte Caecumbesiedelung (HASSAN und CURTISS, III 1996; METHNER und STEINBACH 1997b; DOREA et al. 2010). Untersuchungen von METHNER et al. (2002) zur Interaktion der erhöhten Ak-Titer von Küken KV-geimpfter Elterntiere mit dem Salmonellen-MLV bei der aktiven Immunisierung in den ersten Lebenstagen gaben keinen Hinweis auf eine Einschränkung der Schutzwirkung der MLV-Organismen. HASSAN und CURTISS (1996) fanden, dass eine Impfung in der zweiten und vierten Woche nicht mehr negativ beeinflusst wird.

KV sind im Vergleich zu MLV sicherer in der Anwendung (BARROW 2007). Durch die parenterale Applikation wird sichergestellt, dass jedes Tier die gleiche ausreichende Menge an Impfstoff erhält und es besteht keine Gefahr der Verschleppung und Übertragung der Impforganismen auf den Menschen durch Lebensmittel tierischer Herkunft. Daher haben diese Impfstoffe keine Wartezeit und können im Gegensatz zu lebenden Impforganismen auch während der Legeperiode angewendet werden. Ein weiterer Vorteil von KV ist, dass sie

nicht mit bakteriologischen Nachweismethoden interferieren und diese damit nicht verfälschen können (EFSA 2010).

Andererseits ist die parenterale Applikation teurer als die orale Immunisierung mit MLV über das Trinkwasser. Bei der Nutzung nur einer Impfnadel zur Immunisierung mehrerer Tiere besteht zudem die Gefahr der Übertragung von infektiösen Krankheiten (SPRENG et al. 2006).

Die Schutzimpfung ausschließlich mit KV kann die initiale intestinale Salmonellenbesiedelung nicht verhindern (CERQUETTI und GHERARDI 2000a; CLIFTON-HADLEY et al. 2002), d.h. sie bietet nur einen mäßigen Schutz (GAST et al. 1993; NAKAMURA et al. 1994; CLIFTON-HADLEY et al. 2002) und sollte daher besser mit einem MLV kombiniert werden (COOPER et al. 1994; NASSAR et al. 1994). Um die Sicherheit und Wirksamkeit von Salmonellenimpfstoffen zu gewährleisten, muss an spezifischen stabilen Lebendimpfstämmen bzw. effektiveren KV geforscht werden. Dies impliziert die vollständige Aufklärung der Immunantwort des Huhnes auf die Salmonelleninfektion und speziell für KV die Identifizierung von Major-Immunogenen (BARROW 2007).

### **2.6.3 Futterzusätze**

#### **2.6.3.1 Präbiotika**

Präbiotika sind Substanzen, die die intestinale Mikroflora positiv beeinflussen indem sie das Wachstum oder die Stoffwechselaktivität erwünschter Bakterien stimulieren. Bisher existieren nur begrenzt Informationen über den Effekt auf die Salmonellenkolonisierung. BAILEY (1991) konnte durch die Anwendung von Fructooligosacchariden (FOS) bei Hühnern die intestinale Besiedelung von STM hemmen. Um eine Wirkung erzielen zu können, müssen mindestens 0,75% der Futterration durch FOS substituiert werden. Stellen FOS die einzige Kohlenstoffquelle im Futter dar, wird STM vollständig unterdrückt (BAILEY et al. 1991).

#### **2.6.3.2 Probiotika**

Probiotika sind Bakterien, die im GIT proliferieren und dadurch das intestinale mikrobielle Gleichgewicht verbessern können. Sie sind in der Lage, durch die Inhibition von Pathogenen z.B. durch die Stimulierung der epithelialen Muzinsekretion (MACK et al. 1999) und das Absenken des pH-Wertes im Darm, das Wachstum, die Produktion und die Gesundheit der Tiere zu verbessern (SCHNEITZ und MEAD 2002).

Lactobazillen sollen außerdem über die Fähigkeit verfügen, die Produktion von SIgA zu steigern (MUIR et al. 2000). Verschiedene Untersuchungen zeigten jedoch keinen positiven Effekt auf die Salmonellenabwehr (HINTON und MEAD 1991; STAVRIC et al. 1992;

SCHNEITZ und MEAD 2002). Ein Nachteil von Probiotika ist, dass sie nicht nur Salmonellen-Wildstämme hemmen können, sondern auch oral angewendete MLV (EFSA 2010).

#### **2.6.3.3 Immunstimulanzien**

KOGUT et al. (2010) konnten durch die Zugabe von kationischen Peptiden ins Futter die Effizienz der Heterophilen stimulieren. Die Applikation bei vier Tage alten Küken, deren Immunsystem noch nicht effizient arbeitet, führte zu einer signifikant reduzierten caecalen SE-Besiedelung. Auch oral verabreichte Enterotoxine wie z.B. das Cholera-Toxin, sollen die humorale und/oder zelluläre Immunantwort anregen (MUIR et al. 2000). HUSBAND und BRYDEN (1996) wiesen nach, dass auch einfache Futterkomponenten wie Proteine, Kohlenhydrate, Fette, Vitamine und Mineralien die systemische und mukosale Immunantwort modulieren können, wobei insbesondere die Vitamine A, C und E aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften eine besondere Bedeutung haben (CHEW 1996).

#### **2.6.3.4 Competitive Exclusion**

Als Competitive Exclusion (CE) wird die Übertragung der Darmflora gesunder adulter Tiere auf Küken kurze Zeit nach dem Schlupf bezeichnet. Diese Methode zur Reduzierung der intestinalen Salmonellenbesiedelung beim Geflügel wurde im Jahre 1973 von NURMI und RANTALA beschrieben und wird daher auch als „Nurmi-Konzept“ bezeichnet. Sie erkannten, dass die mit dem Alter abnehmende Empfänglichkeit der Hühner für Salmonellen mit der Entwicklung einer autochtonen Darmflora in den ersten vier bis sechs Lebenswochen zusammenhängt (NURMI und RANTALA 1973; BARNES et al. 1980). Einer der dafür verantwortlichen Mechanismen ist die Konkurrenz um essentielle Nährstoffe und Adhäsionsmöglichkeiten an der Darmwand zwischen der autochtonen Flora und den Salmonellen. Einen weiteren Mechanismus stellt die bakterio-statische Wirkung des niedrigen pH-Wertes dar, der durch die von der autochtonen Flora produzierten flüchtigen Fettsäuren hervorgerufen wird (MEAD und BARROW 1990). Da in der konventionellen Kükenaufzucht der Kontakt zu den Elterntieren fehlt und die Ställe in der Regel gereinigt und desinfiziert werden, wird die Entwicklung der intestinalen Mikroflora verzögert (METHNER 2001). NURMI und RANTALA (1973) entnahmen adulten Tieren eine Suspension aus Kropf- und Darminhalt und applizierten sie oral ein bis zwei Tage alten Küken. Sie konnten damit die Salmonellenempfindlichkeit 24 Stunden später wesentlich senken (NURMI und RANTALA 1973). Auch andere Autoren beschrieben diesen Erfolg in Abhängigkeit bestimmter Faktoren wie z.B. dem Zeitpunkt und der Art der Applikation, die die Schutzwirkung beeinflussen können (SNOEYENBOS et al. 1978; GOREN et al. 1984; BAILEY 1987; SEO et al. 2000; METHNER 2001). In Kombination mit FOS kann die Wirkung der CE potenziert werden (BAILEY et al. 1991).

Die CE-Kulturen zählen entsprechend der VO (EG) 1831/2003 (über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung) zu Futtermittelzusatzstoffen und müssen daher zugelassen werden. Dies ist allerdings nur möglich, wenn die Kulturen aus einer „definierten“ Zusammensetzung bestehen, d.h. die enthaltenen Mikroorganismen bekannt sind. Die Isolierung und Identifikation der Keime aus der natürlichen Darmflora ist allerdings schwierig, da (i) die tatsächlich schützenden Spezies der Darmflora unbekannt sind, (ii) Selektivmedien für nur in geringen Zahlen vorkommende Keime nicht vorhanden sind, (iii) die Keime teilweise nicht anzüchtbar sind und (iv) Identifikationsmöglichkeiten für einzelne Stämme fehlen (METHNER 2001). Das Risiko der Übertragung von geflügel-/humanpathogenen Erregern auf den Menschen kann nicht ausgeschlossen werden, weshalb die Anwendung von CE-Kulturen in Deutschland derzeit nicht zugelassen ist.

#### **2.6.4 Resistente Hühnerlinien**

Wie beschrieben sind sowohl die Salmonellenabwehr als auch die Reaktion auf eine Impfung und damit deren Effizienz von der Genetik der verschiedenen Hühnerlinien abhängig (WIGLEY 2004).

Einige der vermutlich dabei involvierten Gene und „quantitative trait loci“, Regionen eines quantitativen Merkmals, konnten identifiziert und lokalisiert werden. Besondere Aufmerksamkeit gilt dabei den Genen, die für die Entstehung eines Salmonellen-Carrier-Status (s. 2.1.3) verantwortlich sind (CALENGE et al. 2010). Ein Vergleich zwischen den Studien zur Untersuchung der genetischen Abhängigkeit zeigt, dass die für die Salmonellenresistenz verantwortlichen Gene sich in Abhängigkeit der Hühnerlinie, der betrachteten Eigenschaft (z.B. Makrophagenaktivität, humorale Immunantwort) und dem Hühneralter (Jungtier-Resistenz vs. Adulten-Resistenz) unterscheiden (BEAUMONT et al. 2009; CALENGE et al. 2010).

Ein Ansatz zur selektiven Zucht liegt vor, allerdings bestehen Schwierigkeiten in der Harmonisierung mit einer gesteigerten Produktivität und Resistenz gegen andere Geflügelpathogene (EFSA 2010).

#### **2.6.5 Haltung und „Animal Welfare“**

Stresshormone können das Immunsystem schwächen (HUMPHREY 2006) und wie beschrieben die Ausscheidung kontaminierter Eier und Fäzes provozieren, d.h. Erregerträger-Tiere können zu Ausscheidern werden (VAN HOOREBEKE et al. 2010). Demzufolge ist Stressvermeidung ein wichtiger Aspekt in der Bekämpfung von Salmonellen (HUMPHREY 2006). Eine Möglichkeit der Stressvermeidung bietet die Bereitstellung einer für die Tiere artgerechten Haltung. Schon die produktiven Höchstleistungen schränken das Wohlbefinden von Legehennen ein (EFSA 2004). Federpicken (EL-LETHEY et al. 2000) und Kannibalismus sind weitere Stressfaktoren, insbesondere in großen Hühnerbeständen.

Risikofaktoren dafür sind u.a. Futtermittelumstellungen, ein früher Beginn der Legeperiode (PÖTZSCH et al. 2001) sowie fehlende „Pick-Alternativen“ und Angstverhalten, das u.a. durch fehlende Rückzugsmöglichkeiten verursacht wird (HUGHES und DUNCAN 1972). NICOL et al. (2001) zeigten, dass Tiere, welche schon früh mit Sägespänen-Einstreu konfrontiert wurden, sich sehr viel weniger kannibalistisch verhielten und alternativ mehr Zeit mit Staubbaden, Futter- und Bodenpicken verbrachten. EL-LETHEY et al. (2003) wiesen den Zusammenhang zwischen chronischem Stress durch inadäquate Haltung und Einstreu und der Schwächung des Immunsystems nach (EL-LETHEY et al. 2003). Auch hohe Tierdichten und Hitze stellen einen Stress- und Risikofaktor für Salmonelleninfektionen dar (HUMPHREY 2006; HUNEAU-SALAÜN et al. 2009)

Ökologische Landwirtschaft andererseits, die den Tieren eine weitgehend artgerechte Haltung bietet, kann das Risiko eines Salmonellen-Eintrages aus der Umwelt sowie die Verbreitung von Krankheitserregern fördern (HUMPHREY 2006). Vermehrte Einstreu führt zu mehr Staubbildung, Bakterien und Pilzen in der Luft, was nur durch eine effektive Lüftung eingeschränkt werden kann (RODENBURG et al. 2005).

METHNER et al. (2006) wiesen entgegen bisheriger Meinungen nach, dass Haltungssysteme mit Auslauf keinen überdurchschnittlichen Salmonelleneintrag verursachen (METHNER et al. 2006). Dementsprechend sollen Eier aus ökologischer Tierhaltung nicht stärker mit gram-negativen Keimen belastet sein als Eier aus Käfighaltung (DE REU et al. 2006) bzw. konventionellen Legehennenhaltungen (SCHWAIGER et al. 2008).

### 3 TIERE, MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Tiere und Material

##### 3.1.1 Tiere

Für die durchgeführte Studie wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten (39., 54. und 69. Lebenswoche) aus fünf verschiedenen Legehennenhaltungen jeweils zwölf Tiere verwendet. Bei den teilnehmenden Unternehmen handelt es sich um die folgenden:

- (i) Landwirtschaftsbetrieb Hönemann  
Dahlener 20 a  
04889 Sitzenroda  
→ Tiere der Gruppe A  
→ Rasse: Lohmann Brown
- (ii) Schöneberger Geflügelhof Weber GbR  
Hauptstraße 7  
08393 Glauchau  
→ Tiere der Gruppe D  
→ Rasse: Lohmann Brown
- (iii) Hühnerfarm Waldrose GmbH  
01471 Radeburg  
→ Tiere der Gruppe B  
→ Rasse: Lohmann Selected Leghorn (weiße Tiere)
- (iv) Eifrisch-Vertriebsgesellschaft mgH & Co. KG  
09221 Neukirchen  
→ Tiere der Gruppen C und E  
→ Rasse: Lohmann Brown.

Der Zeitpunkt der drei Versuchsdurchgänge wurde durch das Alter der Tiere bestimmt. Um den Verlauf des Schutzes vor Salmonellen durch die Impfung und die Schutzwirkung gegen Ende der Legeperiode darstellen zu können, wurden Legehennen im Alter von circa (ca.) 39, 54 und 69 Lebenswochen (LW) ausgewählt, d.h. Tiere von der Mitte bis zum Ende der Legeperiode. Das exakte Alter der Tiere ist in Tabelle (Tab.) 2 angegeben.

##### 3.1.2 Tierversuchsgenehmigung

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um den am 23.12.2009 beantragten genehmigungspflichtigen Tierversuch, der am 07.03.2010 von der Landesdirektion Leipzig als Tierversuchsvorhaben TVV 38/09 genehmigt wurde.

### 3.1.3 Haltung

Die verwendeten Legehennen wurden aus den Herkunftsbetrieben in den Versuchstierstall (Sicherheitsstufe S 2) des Institutes für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Universität Leipzig gebracht und eingestallt. Die jeweils zwölf Tiere gleicher Herkunft bildeten eine Gruppe und wurden in einer Bucht untergebracht und zur Wiedererkennung beringt. Die ca. zwei Quadratmeter großen Buchten waren mit einem zweikammerigen Legenest, zwei Sitzstangen, einem Futterautomaten und einer Stülpränke ausgestattet. Der Boden war mit gehäckseltem Stroh (Dittmanskörner Milch GmbH, Kitzscher) eingestreut. Die Klimatisierung wurde auf 19 °C und das Lichtregime im Stall auf zwölf Stunden Licht je Tag eingestellt. Futter (Deuka, All Mash L Alleinmehl) und Wasser (aus dem kommunalen Wassernetz) waren für die Tiere *ad libitum* verfügbar.

### 3.1.4 Reinigung und Desinfektion

Nach jedem Versuchsdurchgang wurden die Einstreu, der Versuchstall und sämtliche Stalleinrichtungen und Gegenstände mit 2%iger Peroxyessigsäure (Wolfasteril® E 400, KESLA Pharma Wolfen GmbH, Greppin) desinfiziert, die Einwirkzeit betrug zwei Tage. Anschließend wurde die desinfizierte Einstreu entsorgt und Stall, Stalleinrichtungen und Gegenstände mit Dermalux® (EWABO Chemikalien GmbH & Co KG, Wietmarschen) gereinigt. Die Abschlussdesinfektion wurde entsprechend mit 2%iger Peroxyessigsäure durchgeführt.

### 3.1.5 Impfschemata, Impfstoffe

In Tabelle 2 sind die verschiedenen Versuchsgruppen A bis E gemäß der angewendeten Impfschemata, die vom Zentralverband der Deutschen Geflügelwirtschaft e.V. empfohlen wurden, dargestellt. Bei der modifizierten Lebendvakzine (MLV) 1 (S. Enteritidis (SE)-Impfstamm: attenuiertes Sm/Rif12/Ssq.) handelt es sich um einen attenuierten Streptomycin- und Rifampicin-resistenten SE-Impfstamm, der zudem eine erhöhte Sensitivität für Quinolone aufweist. MLV 2 (SE-Impfstamm: St 441/014, doppelt attenuiert (ade-/his-)) beinhaltet einen plasmidfreien SE-Impfstamm, der eine Adenin- und Histidinauxotrophie aufweist und eine Immunität gegen SE und S. Typhimurium (STM) hervorrufen soll. MLV 3 (STM-Impfstamm: St Nal2/Rif9/RH) stellt einen STM-Impfstamm dar, der resistent gegen die Antibiotika Nalidixinsäure und Rifampicin ist. Bei KV 1 handelt es sich um eine Inaktivatvakzin (KV)-Präparation basierend auf dem formalininaktivierten SE-Stamm vom Phagentyp 4 (SE-Impfstamm: St PT4). KV 2 enthält zudem genannten inkavierten SE-Stamm einen inaktivierten STM-Stamm (STM-Impfstamm: St DT 104).

Die Impfzeitpunkte und -abfolgen sind der folgenden Tabelle 2 zu entnehmen.



Tab. 2 **Einteilung der Gruppen A bis E entsprechend der angewendeten Impfschemata.** Dargestellt sind das Schlupfdatum der Legehennen der Gruppen A bis E, die verwendeten Lebend- und Inaktivimpfstoffe, sowie der Zeitpunkt der jeweiligen Impfung in Lebenstagen (LT) bzw. LW und die Serovar (SE/STM), gegen welche sich die Impfung richtet.

Gruppe	Schlupfdatum	MLV	KV	1.MLV-Impfung	2.MLV-Impfung	3.MLV-Impfung	4.MLV-Impfung	KV-Impfung
A	06.10.2009	MLV1		1.LT	7.LW	15.LW		
B	08.09.2009	MLV2	KV1	4.LT	27.LT (4.LW)	70.LT (10.LW)		119.LT (17.LW)
C	16.09.2009	MLV1 + MLV3		6.LT (MLV1)	42.LT(6.LW) (MLV1)	11.LW (MLV3)	17.LW (MLV1+ MLV3)	
D	18.09.2009	MLV1	KV2	1.LT	7.LW	15.LW		zur Ausstellung (ca.18.LW)
E	26.09.2009	MLV1 + MLV3	KV2	7.LT (MLV1+ MLV3)	41.LT (6.LW) (MLV1)	9.LW (MLV3)	16.LW (MLV1+ MLV3)	zur Ausstellung (ca.18.LW)

### 3.1.6 Infektionsstamm

#### 3.1.6.1 Herkunft und Charakteristika

Der in der Studie verwendete *S. Enteritidis*-Stamm 147Nal<sup>r</sup> wurde freundlicherweise von Dr. U. Methner vom Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen des Friedrich-Loeffler-Institutes, Jena, zur Verfügung gestellt. Dieser SE-Stamm verfügt über eine Nalidixinsäure-resistenz.

#### 3.1.6.2 Aufbewahrung

Nach der Anlieferung wurde die Identität des Bakterienstammes geprüft. Dazu wurden eine serologische Untersuchung und eine Untersuchung auf Nalidixinsäureresistenz durchgeführt. Bis zum Gebrauch wurden die Salmonellenkulturen in 15 %igen Glycerinmedien bei -80°C in 1,5-Milliliter(ml)-Eppendorfgefäßen aufbewahrt.

### 3.1.6.3 Nährmedien

Verwendete Medien (typische Zusammensetzung in Gramm/Liter (g/l)).

#### 3.1.6.3.1 Gepuffertes Peptonwasser

Gepuffertes Peptonwasser nach ISO 6579 (MERCK, Dresden, Artikelnummer (Art.-nr.) 1.07228.0500) wurde entsprechend der amtlichen Sammlung § 64 LFGB zur Voranreicherung der Salmonellen verwendet. Diese ist für den Nachweis geschädigter Salmonellen von Bedeutung.

Tab. 3 Zusammensetzung des gepufferten Peptonwassers.

Verwendete Zutat:	Mengenangabe:
Pepton aus Casein	10,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Kaliumhydrogenphosphat	1,5 g
Di-Natriumhydrogenphosphat Dodecahydrat	9,0 g

Herstellung: 25,5 g werden in 1 Liter demineralisiertem Wasser gelöst und 15 Minuten (min) bei 121 °C autoklaviert.

#### 3.1.6.3.2 Rappaport-Vassiliadis-Medium

Das Rappaport-Vassiliadis-Medium (MERCK, Dresden, Art.-nr. 1.07700.0500) ist ein flüssiges Selektivmedium zur Anreicherung von Salmonellen, die häufig nur in geringer Anzahl anwesend sind und mit einer beträchtlich größeren Anzahl anderer Enterobacteriaceae-Gattungen oder anderer Bakterienfamilien vorkommen.

Tab. 4 Zusammensetzung des Rappaport-Vassiliadis-Medium.

Verwendete Zutat:	Mengenangabe:
Pepton aus Sojamehl	4,5 g
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	28,6 g
Natriumchlorid	7,2 g
Di-Kaliumhydrogenphosphat	0,18 g
Kaliumhydrogenphosphat	1,25 g
Malachitgrün-Oxalat	0,036 g

Herstellung: 41,8 g werden in 1 Liter demineralisiertem Wasser gelöst, in Kolben abgefüllt und bei 115 °C 15 min autoklaviert.

### 3.1.6.3.3 Luria Bertani (LB)-Bouillon

LB-Bouillon (LB-Bouillon LENNOX, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Art.-nr. X964.1) ist ein flüssiges Medium zur Kultivierung von Bakterien. Salmonellen wachsen in diesem Medium ungehemmt.

Tab. 5 Zusammensetzung der LB-Bouillon.

Verwendete Zutat:	Mengenangabe:
Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Natriumchlorid	5,0 g

Herstellung: 20 g Trockenmedium werden in 1 Liter Wasser gelöst und bei 121 °C für 15 min autoklaviert.

### 3.1.6.3.4 LB-Agar

LB-Agar (LB-Agar LENNOX, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Art.-nr. X965.1) ist ein festes Medium zur Kultivierung von Bakterien. Salmonellen wachsen auf diesen Böden ungehemmt.

Tab. 6 Zusammensetzung des LB-Agar.

Verwendete Zutat:	Mengenangabe:
Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Agar-Agar	15,0 g

Herstellung: 35 g Trockenmedium in 1 Liter Wasser lösen, bei 121 °C für 15 min autoklavieren.

### 3.1.6.3.5 Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD-Agar)

XLD-Agar nach harm. EP/USP/JP (MERCK, Dresden, Art.-nr. 1.05287.0500) ist ein festes Selektivnährmedium zur Isolierung von Salmonellen nach der Anreicherung. Die durch die Lysin-Decarboxylase der Salmonellen hervorgerufene Alkalisierung führt zu einem Farbumschlag des Nährbodens von himbeerrot zu rotviolett. Die Salmonellen-Kolonien erscheinen blassrosa bis farblos und weisen meist ein schwarzgefärbtes Zentrum auf.

Tab. 7 Zusammensetzung des XLD-Agar.

Verwendete Zutat:	Mengenangabe:
Hefeextrakt	3,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
D(+)-Xylose	3,75 g
Lactose	7,5 g
Saccharose	7,5 g
L(+)-Lysin	5,0 g
Natriumdesoxycholat	1,0 g
Natriumthiosulfat	6,8 g
Ammoniumeisen(III)-citrat	0,8 g
Phenolrot	0,08 g
Agar-Agar	14,5 g

Herstellung: 55 g werden in 1 Liter demineralisiertem Wasser durch Erhitzen im siedenden Wasserbad vollständig gelöst. Die Lösung darf nicht autoklaviert werden!

#### 3.1.6.3.6 XLD-Agar, modifiziert mit 50 µg/ml Nalidixinsäure-Zusatz:

Die Zusammensetzung des XLD-Agars entspricht der angegebenen Zusammensetzung, bei der Herstellung wird der Ansatz um 1 ml Aqua bidestillata (bidest.) reduziert. Nach dem Abkühlen des Agars auf 50 °C, wird 1 ml einer 5%igen Nalidixinsäure-Stammlösung (s. Anhang: Tab. 10) pro 999 ml Nährmedium zugegeben. Der flüssige Agar wird gut gemischt und zu Platten gegossen.

Mit der Zugabe der Nalidixinsäure für welche der Infektionsstamm eine Resistenz aufweist, sollte das Wachstum anderer Keime minimiert werden.

#### 3.1.6.3.7 Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar (BPLS-Agar)

BPLS-Agar (MERCK, Dresden, Art.-nr. 1.07232.0500) dient als zusätzliches festes Selektivnährmedium zur Isolierung von SE nach der Anreicherung. SE zeigt auf diesem Nährboden ein gutes Wachstum mit rosafarbenen Kolonien auf rotem Boden. Gram-positive Bakterien werden weitgehend gehemmt.

Tab. 8 Zusammensetzung des BPLS-Agar.

Verwendete Zutaten:	Mengenangaben:
Pepton aus Casein	5,0 g
Pepton aus Fleisch	5,0 g
Hefeextrakt	3,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Lactose	10,0 g
Saccharose	10,0 g
Phenolrot	0,08 g
Brillantgrün	0,0125 g
Agar-Agar	13,0 g

Herstellung: 51 g werden in 1 Liter demineralisiertem Wasser durch Erhitzen im siedenden Wasserbad gelöst und anschließend bei 121 °C 15 min autoklaviert.

#### 3.1.6.3.8 BPLS-Agar, modifiziert mit 50 µg/ml Nalidixinsäure-Zusatz:

Die Zusammensetzung des BPLS-Agars entspricht der angegebenen Zusammensetzung. Bei der Herstellung wird der Ansatz um 1 ml Aqua bidest. reduziert. Nach Abkühlen des Agars auf 50 °C, wird 1 ml einer 5%igen Nalidixinsäure-Stammlösung pro 999 ml Nährmedium zugegeben. Der flüssige Agar wird gut gemischt und zu Platten gegossen.

## 3.2 Methoden

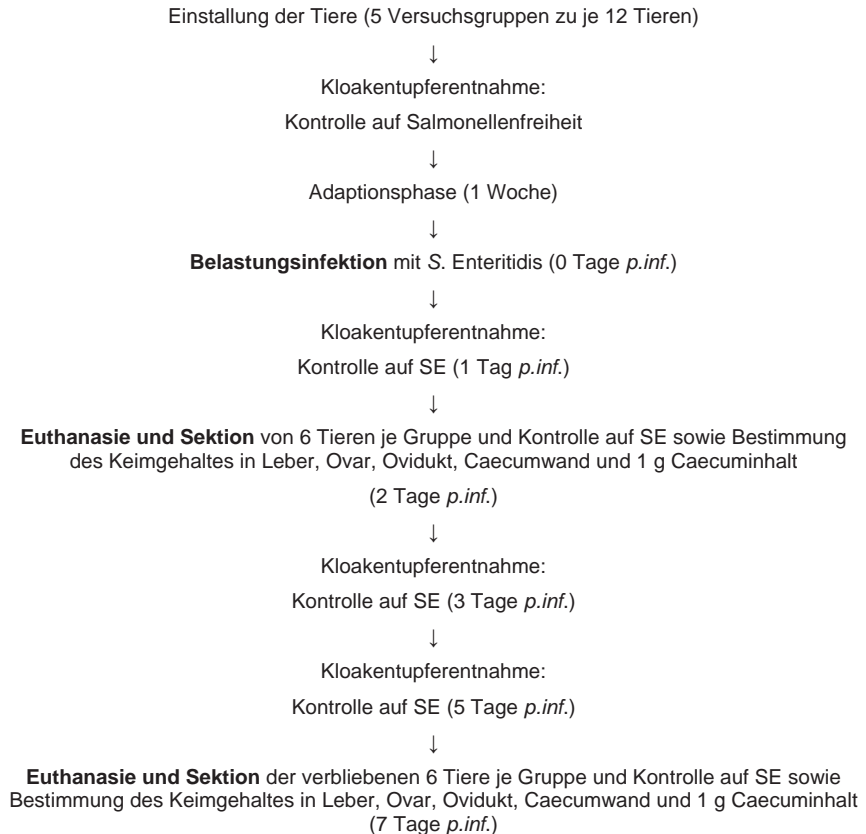
### 3.2.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

Abbildung (Abb.) 1 auf der folgenden Seite gibt den Versuchsablauf eines jeden Versuchszeitpunktes wieder. In Abbildung 2 auf Seite 38 ist der gesamte Versuchsablauf mit den drei Versuchszeitpunkten 39., 54. und 69. LW dargestellt. Nach der Einstellung wurden die Tiere zunächst mittels Kloakentupferuntersuchung auf Salmonellenfreiheit getestet. Nach der Adaptionszeit von einer Woche wurde jedes Tier mit dem beschriebenen SE-Stamm infiziert. Ein Tag nach der Infektion wurden die ersten Kloakentupferproben zur Kontrolle der Ausscheidung des Infektionsstammes entnommen. Zwei Tage nach der Infektion wurden per Zufallsprinzip sechs Tiere aus jeder Gruppe ausgewählt und euthanasiert. Die Tiere wurden mittels Kopschlag betäubt und unter Blutentzug und Genickbruch getötet. Unmittelbar auf die Tötung folgte die Sektion der Tiere und die sterile Entnahme der Caeca inklusive Inhalt, Leber, Ovidukt und Ovar. Im Labor wurden die Organproben weiterverarbeitet und

Untersuchungen zum qualitativen sowie quantitativen Nachweis des Infektionsstammes durchgeführt.

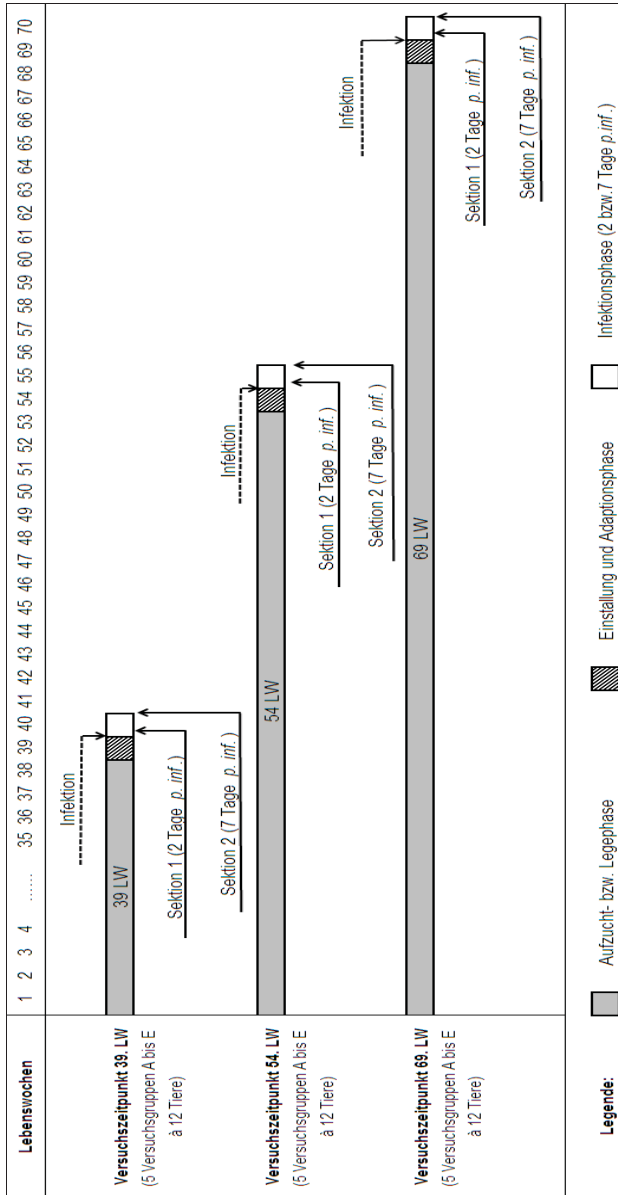
Drei und fünf Tage *post infectionem* (*p.inf.*) wurden wiederholt Kloakentupferproben entnommen, um den Verlauf der SE-Ausscheidung aufzeichnen zu können. Sieben Tage nach der Infektion wurden die verbleibenden sechs Tiere je Bucht und Versuchsgruppe euthanasiert, sezziert, Organproben entnommen und untersucht.

---




---

Abb. 1 Flussdiagramm zur **Darstellung des Ablaufs eines Versuchszeitpunktes.**



## 3.2.2 Infektion

### 3.2.2.1 Herstellung des Inokulums und Bestimmung der Infektionsdosis

Zwei Tage vor der Infektion wurde der SE-Infektionsstamm mit einer sterilen Kunststoffimpföse (bicappaLAB, Italien) aus der Tiefkühlstammkultur auf zwei LB-Platten (LB LENNOX, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) mit 50 µg/ml Nalidixinsäure (Fluka Biochemica, Buchs, Schweiz) übertragen und ausgestrichen. Diese wurden aerob bei 37°C für 24 Stunden (h) im Brutschrank (Heraeus, Hanau) inkubiert.

Jeweils eine der sich auf den Platten gebildeten Kolonien wurden in drei sterile 10 ml-Glasröhrchen mit Stülpdeckel, die mit fünf ml LB-Bouillon (LB Bouillon LENNOX, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) und 5 Mikroliter (µl) Nalidixinsäure (50 mg/ml Nalidixinsäure) befüllt worden waren (= 50 µg/ml Nalidixinsäure), überimpft. Über einen Zeitraum von ca. 16 h wurden die drei Ansätze bei 37°C in einem Horizontalschüttler (Certomat S, B.Braun, Biotech International, Melsungen) mit einer Frequenz von 130 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Anschließend wurden in drei 1000 ml-Erlenmeyerkolben (Duran GL 32, Schott, Mainz), die mit jeweils 247,5 ml LB-Medium befüllt worden waren, jeweils 2,5 ml der inkubierten Kulturen mit einer Eppendorf-Pipette (eppendorf Research, Hamburg) mit aufgesetzter steriler Kunststoffpipettenspitze (bicappaLAB srl, Italien) überführt. Nachfolgend wurden die Kulturen in den Kolben im Horizontalschüttler bei 37 °C weiterbebrütet.

Da das Keimwachstum in der Bouillon mit der Trübung dieser korreliert, wurde die Wachstumskontrolle mithilfe der Messung der optischen Dichte der Bouillon am Spektralphotometer (Nano Drop 2000c Spectrophotometer, Peq Lab, Erlangen) durchgeführt. Zuvor angefertigte Wachstumskurven zeigten, dass eine optische Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,5 einem Keimgehalt von  $1 \times 10^8$  Koloniebildenden Einheiten (KbE)/ml entspricht. Sobald die Bouillons in den drei Kolben diese optische Dichte erreicht hatte, wurde die Bouillon in sterile 50 ml-Kunststoffflacons (Techno Plastic Products AG, Trasadingen) aufgeteilt und bei 3000 xg über 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert (Biofuge Stratos, Heraeus, Hanau), so dass sich am Boden des Flacons ein Bakterienpellet bildete. Der Überstand im Flacon wurde verworfen, und dem verbleibenden Pellet wurden 5 ml kühl-schrankkaltes Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline-PBS) (s. Anhang: Tab. 11) hinzugefügt. Da dies einem Zehntel des ursprünglichen Volumens entspricht, wurde der Keimgehalt auf die gewünschten  $1 \times 10^9$  KbE/ml eingestellt. Um das Salmonellen-Pellet in der PBS-Lösung vollständig zu suspendieren, wurde es ausreichend lange mit einem Reagenzglasschüttler gemischt (Vortexer REAX 2000, Firma Heidolph, Schwabach). Nachdem alle Pellets suspendiert waren, wurde der Inhalt der Flacons in einer sterilen 500 ml-Glasflasche mit Schraubverschluss (Duran GL 45, Schott, Mainz) vereinigt.



Die Überprüfung des tatsächlichen Keimgehaltes erfolgte mit dem Oberflächenspatel-Verfahren. Dazu wurde die hergestellte Infektionsbouillon mittels einer dekadischen Verdünnungsreihe (in PBS) verdünnt. Um die Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  zu erhalten, wurden von dem Inokulum 100 µl entnommen und zu 900 µl Verdünnungslösung PBS in sterilen 2 ml-Eppendorf-Gefäßen gegeben und mittels Reagenzglasschüttler gemischt. Die Herstellung weiterer Verdünnungsstufen bis  $10^{-8}$  erfolgte entsprechend. Von den Verdünnungsstufen  $10^{-6}$  bis  $10^{-8}$  wurden jeweils 100 µl auf jeweils zwei LB-Agar-Platten (Doppelansatz) mit einem sterilen Kunststoffspatel (VWR International GmbH, Dresden) ausplattiert. Diese sechs Platten wurden für 24 h bei 37°C inkubiert und die Kolonien der Platten der beiden höchsten Verdünnungsstufen, auf welchen ein Wachstum stattgefunden hatte, ausgezählt. Mithilfe der unter „Keimzahlbestimmung“ (s. 3.2.4.2.1.2) angeführten Formel wurde dann der tatsächliche Salmonellengehalt und damit die Infektionsdosis berechnet (s. 4.1). Nachdem die 100 µl zur Bestimmung des Keimgehaltes aus der Infektionsbouillon entnommen worden waren, wurde die Glasflasche unverzüglich in einer mit zerkleinertem Eis gefüllten Styroporbox gekühlt und zur Infektion in den Stall transportiert.

### **3.2.2.2 Verabreichung und Dosierung**

Von dem Inokulum, das auf eine Konzentration von  $1 \times 10^9$  KbE/ml eingestellt worden war, wurde jedem Tier 1 ml (=  $1 \times 10^9$  KbE SE) verabreicht. Der Schnabel der Tiere wurde fixiert und mittels einer geraden 12 Millimeter (mm) langen Knopfkanüle (Henry Schein®, Hamburg) mit aufgesetzter 1 ml Einmalspritze (Henry Schein®, Hamburg) wurde das Inokulum direkt in den Kropf instilliert. Um ein Regurgitieren zu vermeiden, wurde der Kopf für einige Sekunden nach der Instillation weiter fixiert gehalten.

### **3.2.3 Klinische und pathologisch-anatomische Diagnostik**

Während des Versuches wurden die Tiere täglich auf das Allgemeinbefinden, klinisches Gesamtbild und Durchfallsymptomatik untersucht. In den Sektionen wurden die Tiere auf makroskopische pathologisch-anatomische Veränderungen überprüft.

### **3.2.4 Kulturelle Diagnostik**

#### **3.2.4.1 Kloakentupferproben**

Die erste Kloakentupferentnahme fand einen Tag nach der Einstellung statt um die Salmonellenfreiheit der Tiere vor Versuchsbeginn nachzuweisen. Um den Verlauf der Ausscheidung des Infektionsstammes während des Versuches zu überprüfen, wurden an den Tagen eins, drei und fünf *p.inf.* von jedem Tier eine Kloakentupferprobe entnommen. Dazu wurden sterile, einzeln verpackte Abstrichbestecke mit Amies-Medium (Heinz Herenz,

Hamburg) verwendet. Die sterilen Tupfer wurden in die Kloake eingeführt und dann in die beschrifteten Transportröhrchen mit dem Amies-Medium gesteckt.

Die Tupfer wurden in das Labor des Institutes für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen gebracht und dem angeführten Schema (s. Abb. 3) entsprechend bakteriologisch untersucht.

---

**1. Nicht selektive Anreicherung**

Tupfer in 9 ml Peptonwasser

Inkubation: 18-24 h; 37 °C



**2. Selektive Anreicherung**

100 µl der Voranreicherung in 9,9 ml Rappaport Vassiliadis Medium

Inkubation: 24 h; 42 °C



**3a. Ausstreichen**

Fraktioniertes Ausstreichen der  
Anreicherung auf XLD-Agar  
(mit 50 µg/ml Nalidixinsäure)

Inkubation: 24 h, 37°C

**3b. Ausstreichen**

Fraktioniertes Ausstreichen der  
Anreicherung auf BPLS-Agar  
(mit 50 µg/ml Nalidixinsäure)

Inkubation: 24 h, 37°C

---

Abb. 3 Flussdiagramm zur **bakteriologischen Untersuchung der Kloakentupfer**.

In einem ersten Schritt wurden die Kloakentupfer in mit 9 ml Peptonwasser befüllte 13 ml-Kunststoffröhrchen (Kulturröhrchen mit Schnappkappe, Techno Plastic Products AG, Trasadingen) überführt und bei 37 °C 18-24 h inkubiert. In einem zweiten Schritt wurde diese Voranreicherung zunächst gemischt, 100 µl daraus entnommen und zur selektiven Anreicherung in ein mit 9,9 ml Rappaport-Vassiliadis-Medium befülltes 13 ml-Kunststoffröhrchen pipettiert und für 24 h bei 42 °C inkubiert (Heraeus Instruments, Hanau). In einem dritten Schritt wurde das inkubierte Rappaport-Vassiliadis-Medium zunächst gemischt und anschließend mithilfe einer sterilen gläsernen Impfüse fraktioniert auf einem BPLS-Agarboden und einem XLD-Agarboden ausgestrichen. Für den Nachweis der Salmonellenfreiheit wurden Nährböden ohne Antibiotikum verwendet, für den Nachweis des Infektionsstammes wurden Nährböden, die mit 50 µg/ml Nalidixinsäure versetzt worden waren, verwendet. Anschließend wurden die Nährböden bei 37 °C für 24 h inkubiert. Auf die Inkubation folgte die Untersuchung der Agarböden auf Salmonellen-verdächtige Kolonien.

Zur Absicherung der Salmonellenfreiheit wurden verdächtige Kolonien entsprechend dem Prinzip der Objektträgerschnellagglutination (OSA) mit einem multivalenten Antiserum (Enterocolon Anti-Salmonella Gr.A-E, SIFIN, Berlin) agglutiniert. Zur Absicherung des Nachweises des SE-Infektionsstammes wurden die verdächtigen Kolonien mit einem omnivalenten Antiserum (Enterocolon Anti-Salmonella Gr.D, SIFIN, Berlin) agglutiniert.

#### **3.2.4.2 Organproben**

Für die sterile Organentnahme wurde die Körperoberfläche der Tiere mit Ethanol (70%ig, BfB Bundesmonopolverwaltung für Branntwein, Lutherstadt Wittenberg) desinfiziert und die Bauchhöhle eröffnet. Es folgte die Untersuchung des Körpersitus und der Organe auf pathologische Veränderungen sowie die Dokumentation darüber. Anschließend wurden die beiden Caeca mit Inhalt und Organproben von Leber, Ovidukt und Ovar entnommen und in beschriftete sterile Petrischalen (Techno Plastic Products AG, Trasadingen) überführt. Diese wurden unverzüglich in einer Isolierbox auf zerkleinertem Eis gekühlt und in das Labor des Institutes transportiert.

Im Labor wurden aus den Caeca zunächst jeweils 1 g Caecuminhalt steril entnommen und in sterile mit 9 ml Peptonwasser befüllte 13 ml-Kunststoffröhrchen überführt (weitere Aufarbeitung der Proben s. unten). Mithilfe einer elektronischen Präzisionswaage (Aesculab, Tuttlingen) wurden jeweils 750 Milligramm (mg) der Leber-, Ovar- und Oviduktproben sowie den Caeca, von welchen nach der Caecuminhaltentnahme überwiegend Anteile der Caecumwand übriggeblieben waren, abgewogen und in beschriftete Homogenisatorröhrchen (2 ml Precyllis Keramik Kit 1,4 mm, PeqLab, Erlangen) abgefüllt. Jedes der befüllten Homogenisatorröhrchen wurde mit 750 µl sterilem PBS aufgefüllt, das heißt (d.h.) ein Organ-PBS-Gemisch von 1:1 hergestellt. Dieses Gemisch wurde dann in einem Homogenisator (Precyllis, PeqLab, Erlangen) in drei aufeinanderfolgenden zehn Sekunden andauernden Zyklen bei 6800 Umdrehungen pro Minute homogenisiert. Bei jedem Zyklus wurden die Homogenisatorröhrchen intensiven dreidimensionalen Schüttelbewegungen ausgesetzt. Die dadurch hochbeschleunigten Aufschlusskügelchen in den Schraubdeckelröhrchen führten zu einer Zermahlung des Organmaterials. Die Pausen zwischen den Zyklen betrugen 30 Sekunden.

#### **3.2.4.2.1 Quantitative Untersuchung**

##### **3.2.4.2.1.1 Direktausstriche und Verdünnungsreihe der Organhomogenate**

Jeweils 100 µl der Organhomogenate von Leber, Ovar und Ovidukt wurden auf zuvor beschriftete XLD- und BPLS- Nährböden (jeweils mit 50 µg/ml Nalidixinsäure) mithilfe steriler Kunststoffspatel (VWR International GmbH, Dresden) ausplattiert. Die

Direktausstriche der Caecumwandhomogenate wurden entsprechend angefertigt, allerdings wurden ausschließlich XLD-Nährböden mit 50 µg/ml Nalidixinsäure verwendet.

Für die dekadischen Verdünnungsreihen wurden 13-ml-Kunststoffröhrchen, die mit 4,5 ml kühl-schrankkaltem PBS vorgelegt worden waren, mit 500 µl eines jeden Organhomogenates beimpft, um die Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  zu erhalten. Diese verdünnten Gemische wurden anschließend jeweils für drei Sekunden mit einem Reagenzglasschüttler ausreichend homogen gemischt und für die Herstellung weiterer Verdünnungsstufen auf die gleiche Weise verwendet. Die Caecumwandhomogenate wurden bis zur Verdünnungsstufe  $10^{-4}$  und die Homogenate der inneren Organe Leber, Ovar und Ovidukt bis  $10^{-1}$  verdünnt. Das Peptonwasser-Caecuminhalt-Gemisch, das der Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  entsprach, wurde homogen gemischt und wie das Caecumwandhomogenat bis zum Verdünnungsgrad  $10^{-4}$  weiterverdünnt.

Von jeder der Verdünnungsstufen wurden 100 µl entnommen, auf einen XLD-Nährboden (mit 50 µg/ml Nalidixinsäure) pipettiert und ausplattiert. Die Verdünnungsreihen von Leber, Ovar und Ovidukt wurden zudem auf BPLS-Nährböden (mit 50 µg/ml Nalidixinsäure) ausplattiert. Die beschrifteten Agarplatten wurden in den Brutschrank verbracht und bei 37 °C über 24 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Platten auf verdächtige Kolonien untersucht und mittels OSA mit omnivalenten Antiseren der Gruppe D bestätigt.

#### 3.2.4.2.1.2 Keimzahlbestimmung

Nachdem die Salmonellen-verdächtigen Kulturen auf den Platten identifiziert worden waren, erfolgte die Zählung der Kolonie bildenden Einheiten der verschiedenen Verdünnungsstufen. Anschließend wurde mithilfe der angeführten Formel der mittlere Keimgehalt bestimmt. Da die Organproben vor der Homogenisierung im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt worden war, wurde das Ergebnis für den mittleren Keimgehalt verdoppelt. Das Ergebnis dieser Verdoppelung ergab den tatsächlichen Keimgehalt.

Formel zur Berechnung des **gewichteten arithmetischen Mittelwertes**:

$$\bar{c} = \frac{\Sigma c}{n_1 \cdot 1 + n_2 \cdot 0,1} \times d \times 10$$

Legende:

- ĉ: gewichteter arithmetischer Mittelwert der Koloniezahlen
- Σc: Summe der Kolonien aller Platten, die zur Berechnung herangezogen werden
- n<sub>1</sub>: Anzahl der Platten der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe
- n<sub>2</sub>: Anzahl der Platten der nächst höheren Verdünnungsstufe
- d: Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe

### 3.2.4.2.2 Qualitative Untersuchung

Das in den Homogenisatorröhrchen verbleibende Organmaterial (Caecumwand, Leber, Ovar, Ovidukt), das 1 g entsprach, wurde in beschriftete mit 9 ml Peptonwasser befüllte sterile 13-ml-Kunststoffröhrchen überführt und für 30 Sekunden mit dem Reagenzglasschüttler gemischt. Diese Organ-Peptonwasser-Bouillons sowie die Peptonwasser-Bouillon des Caecuminhaltes (s. 3.2.4.2) wurden in den Brutschrank verbracht und bei 37 °C für 18-24 h inkubiert. Die weitere Aufarbeitung der Proben erfolgte entsprechend der Kloakentupfer (s. Abb. 3). Jeweils 100 µl der nicht-selektiven Voranreicherung einer jeden Organprobe und des Caecuminhaltes wurden in 9,9 ml Rappaport-Vassiliadis-Medium überführt und bei 42 °C für 24 h inkubiert. Anschließend wurde das inkubierte Medium mit einer sterilen Kunststoffimpföse fraktioniert auf einem XLD- und einem BPLS-Nährboden mit jeweils 50 µg/ml Nalidixinsäure ausgestrichen. Nach der Inkubation (37 °C, 24 h) wurden die Nährböden auf Salmonellen-verdächtige Kolonien untersucht und diese mithilfe der OSA mit omnivalenten Antiseren der Gruppe D verifiziert.

### 3.2.5 Statistische Auswertung

Die bei der quantitativen Untersuchung ermittelten Werte für den Salmonellengehalt in den verschiedenen Organen wurden statistisch innerhalb einer Gruppe, d.h. zwischen den verschiedenen Versuchszeitpunkten sowie den Sektionen 1 und 2 gegeneinander ausgewertet. Zudem wurde ein Vergleich zwischen den Impfgruppen A und D bzw. C und E durchgeführt. Dafür wurden die Ergebnisse zunächst auf Normalverteilung geprüft und die nicht-normalverteilten Werte anschließend mithilfe des Mann-Whitney-Test auf signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) überprüft. Die grafische Darstellung der ermittelten Keimzahlen erfolgte durch „Boxplots“ (Kastengrafik). Die Box entspricht dem Bereich, in dem 50% der Werte liegen und ist entsprechend durch das obere und untere Quartil begrenzt. Der Median ist durch einen horizontalen Strich in der Box gekennzeichnet, bzw. wenn der Median null beträgt, liegt er auf der x-Achse am unteren Ende der Box. Die Enden der vertikalen Fortsätze der Box, die sogenannten Whiskers, stellen Maximal- bzw. Minimalwerte dar. Liegen diese Werte außerhalb des 1,5-fachen des Interquartilabstandes (Länge der Box), werden sie als Dreiecke, sogenannte Ausreißer, dargestellt. Signifikante Unterschiede werden mit einem schwarzen Stern gekennzeichnet und die jeweiligen Bezugsgrößen (Sektionen, Versuchszeitpunkte, Gruppen im Vergleich) mit Bügeln markiert.

Die statistische Auswertung der qualitativen Ergebnisse der Organ- und Kloakentupferproben wurde unter der Verwendung des Chi-Quadrat-Testes durchgeführt und auf signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sowohl innerhalb, d.h. zwischen den Versuchszeitpunkten und Sektionen, als auch zwischen den Gruppen A und D bzw. C und E, überprüft. Die grafische Darstellung der qualitativen Ergebnisse erfolgt als Balkendiagramme, die den prozentualen Anteil Salmonellen-positiver Ergebnisse

wiedergeben. Signifikante Unterschiede werden auch in diesen Abbildungen mit schwarzen Sternen und Bügeln gekennzeichnet.

Die rechnerische Bearbeitung der Daten erfolgte unter Zuhilfenahme der Software PASW<sup>®</sup> Statistics 18 für Windows. Für die grafische Bearbeitung der quantitativen bzw. qualitativen Ergebnisse wurden PASW<sup>®</sup> Statistics 18 für Windows bzw. Microsoft Office Excel 2003 verwendet.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Salmonellengehalt des Inokulums

Die Bestimmung des Salmonellengehaltes des Inokulums erbrachte in der 39. Lebenswoche (LW) eine Keimzahl von  $1,63 \times 10^9$  Kolonie bildende Einheit (KbE)/g, in der 54. LW eine Keimzahl von  $1,90 \times 10^9$  KbE/g und in der 69. LW eine Keimzahl von  $1,29 \times 10^9$  KbE/g (s. Tabelle (Tab.) 9).

Tab. 9 **Tatsächlicher Keimgehalt des Inokulums.** Die Ergebnisse der Keimzahlbestimmung des Inokulums werden in KbE Salmonellen/Gramm (g) zu den drei Versuchszeitpunkten (39., 54., und 69. LW) angegeben.

Versuchszeitpunkt	Salmonellengehalt in KbE/g
39. LW	$1,63 \times 10^9$
54. LW	$1,90 \times 10^9$
69. LW	$1,29 \times 10^9$

### 4.2 Nachweis der Salmonellenfreiheit

Die Kloakentupferentnahmen und deren qualitative Untersuchung ein Tag nach Einstellung wurden zu jedem Versuchszeitpunkt (39., 54., 69. LW) durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Tiere frei von Salmonellen der Serogruppen A-E waren. Die Untersuchungen ergaben für alle Tiere ein negatives Ergebnis, womit die Salmonellenfreiheit bestätigt werden konnte.

### 4.3 Ergebnisse der Gruppen im Versuchsverlauf

Im Folgenden werden die Untersuchungsergebnisse jeder einzelnen Impfgruppe dargestellt (s. Tab. 2).

#### 4.3.1 Gruppe A

Gruppe A wurde dreimal mit der modifizierten Lebendvakzine (MLV) MLV 1 (S. Enteritidis-Impfstamm: attenuiertes Sm/Rif12/Ssq.) geimpft.

#### **4.3.1.1 Klinische Beobachtungen**

Die klinischen Beobachtungen erfolgten während der drei Versuchsdurchläufe täglich über einen Zeitraum von zehn Tagen bei den ersten sechs euthanasierten Tieren bzw. von 16 Tagen bei den verbleibenden sechs Tieren.

Die Tiere der Gruppe A zeigten zu keinem Versuchszeitpunkt klinische Symptome einer Salmonellose oder einer anderen Krankheit.

Auffällig war, dass der Zustand der Tiere (Befiederung, Bemuskelung, Verhalten) in der 69. LW im Vergleich zu den vorhergehenden Versuchszeitpunkten reduzierter erschien. Während der täglichen Beobachtungszeiträume wurde Tier 62 von den anderen Tieren verfolgt und gepickt. Es hielt sich vermehrt im Legenest auf.

#### **4.3.1.2 Ausscheidung des Infektionsstammes**

Die Kloakentupferproben wurden qualitativ auf das Vorhandensein von Salmonellen untersucht. Zu jedem Versuchszeitpunkt (39., 54., 69. LW) fanden drei Probenentnahmen statt (ein, drei und fünf Tage *post infectionem* (*p.inf.*)). An Tag 1 *p.inf.* standen alle zwölf Tiere der Beprobung zur Verfügung, an den Tagen 3 und 5 *p.inf.*, das heißt (d.h.) nach der Sektion 1 (zwei Tage *p.inf.*), war die Hälfte der Tiere bereits euthanasiert und konnte daher nicht mehr beprobt werden.

Die Ausscheidung des Infektionsstammes nahm mit dem Alter der Legehennen zu. In der 39. LW konnten keine Salmonellen in den Kloakentupfern nachgewiesen werden. In der 54. LW waren an Tag drei *p.inf.* 50% der Tiere Salmonellen-positiv. In der 69. LW wurden zu jedem Entnahmezeitpunkt Salmonellen nachgewiesen. Der prozentuale Anteil positiver Tupferproben lag bei 25%, 33,33% und 16,67% (s. Anhang: Tab. 45-47).

#### **4.3.1.3 Pathologisch-anatomische Beobachtungen**

Bei den Tieren der Versuchszeitpunkte 39. und 69. LW fielen in den Sektionen 1 und 2 keine Veränderungen der Organe auf. Tier 90 des zweiten Versuchsdurchlaufes (Sektion 1, 54. LW) hatte ggr. (geringgradige) Verwachsungen und fibrinöse Auflagerungen am Darmkonvolut.

#### **4.3.1.4 Caecumwand und Caecuminhalt**

##### **4.3.1.4.1 Qualitative Auswertung**

Zur qualitativen Untersuchung der Caeca auf SE wurden die Caecuminhalt- und Caecumwandproben zunächst in einem unselektiven und anschließend in einem selektiven Anreicherungsmedium inkubiert. Die Ergebnisse beziehen sich auf Sektion 1 (zwei Tage *p.inf.*) und Sektion 2 (sieben Tage *p.inf.*) der drei verschiedenen Versuchszeitpunkte (39., 54. und 69. LW).



Der Nachweis von *S. Enteritidis* (SE) in der Caecumwand und im Caecuminhalt der Gruppe A nahm mit dem Alter der Legehennen zu (s. Abbildung (Abb.) 4). Zu jedem Versuchszeitpunkt konnte eine Abnahme des Salmonellennachweises von Sektion 1 zu Sektion 2 verzeichnet werden. Sieben Tage *p.inf.* (Sektionen 2) waren nur zu den Versuchszeitpunkten 54. und 69. LW in den Caecumwänden von jeweils 16,67% der Tiere Salmonellen nachzuweisen (s. Anhang: Tabelle (Tab.) 16, 18, 20). Generell waren in der Caecumwand häufiger Salmonellen nachzuweisen als im Caecuminhalt.

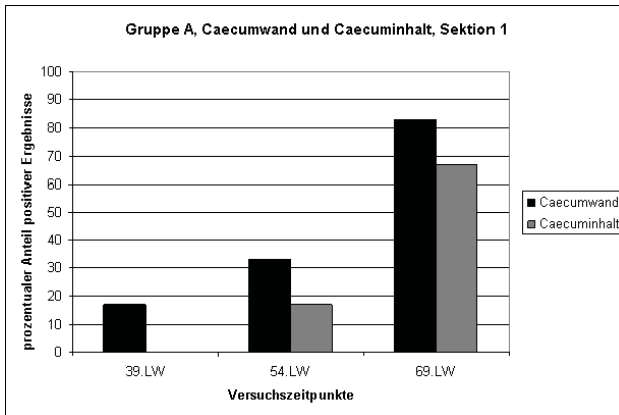


Abb. 4 **Balkendiagramm zur Darstellung qualitativ SE-positiver Caeca.** Salmonellen-positive Befunde (in %) in Caecumwand (schwarz) und Caecuminhalt (grau) in der Sektion 1 (2 Tage *p.inf.*) der Gruppe A zu den Versuchszeitpunkten 39., 54. und 69. LW.

#### 4.3.1.4.2 Quantitative Auswertung

Um nicht nur eine qualitative Aussage über das Vorhandensein von Salmonellen treffen zu können, wurden die Organproben mittels Direktausstrichen der Verdünnungsgreihen auch quantitativ auf Salmonellen untersucht. Teilweise konnten die Salmonellen erst nach der Anreicherung nachgewiesen werden, eine Quantifizierung war daher nicht bei jeder qualitativ positiven Organprobe möglich.

Wie für die qualitative Auswertung wurden die Ergebnisse für die Sektionen 1 und 2 der verschiedenen Versuchszeitpunkte aufgezeigt und der Median bestimmt.

Bis auf die Caeca von vier Tieren der Sektion 1, 69. LW war ein quantitativer Nachweis der Salmonellen nicht möglich. In der genannten Sektion war der Keimgehalt im Caecuminhalt (Median=  $9,0 \times 10^1$  KbE/g) höher als der Keimgehalt in der Caecumwand (Median=  $1,36 \times 10^1$  KbE/g) (s. Anhang: Tab. 15-20).

#### 4.3.1.5 Leber

##### 4.3.1.5.1 Qualitative Auswertung

Der qualitative Salmonellennachweis nahm in Gruppe A mit dem Alter der Legehennen in den Leberproben zu. In der Sektion 2 der 69. LW konnte bei einem Maximum von 83,33% der Tiere SE in der Leber nachgewiesen werden. Zu Jedem Versuchszeitpunkt waren in der Sektion 2 sieben Tage *p.inf.* häufiger Salmonellen nachzuweisen als in der Sektion 1 zwei Tage *p.inf.* (s. Abb. 5).

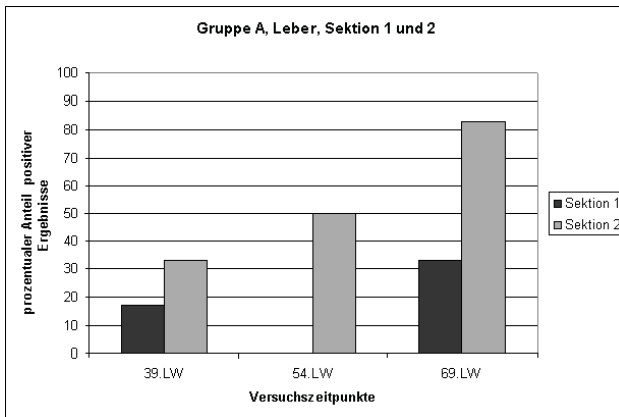


Abb. 5 **Balkendiagramm zur Darstellung qualitativ SE-positiver Leberproben.** Salmonellen-positive Befunde (in %) in den Leberproben der Sektionen 1 (schwarz) und 2 (grau) (2 und 7 Tage *p.inf.*) der Gruppe A zu den Versuchszeitpunkten 39., 54. und 69. LW.

##### 4.3.1.5.2 Quantitative Auswertung

In der 39. LW konnten in den Leberproben keine Salmonellen quantitativ nachgewiesen werden und damit weniger als zu den anderen Versuchszeitpunkten.

In den Sektionen 1 (zwei Tage *p.inf.*) war ein quantitativer SE-Nachweis ausschließlich bei einem Tier in der 69. LW möglich. In den Sektionen 2 (sieben Tage *p.inf.*) konnten in der 54. und 69. LW derselbe Median von  $1,36 \times 10^1$  KbE/g bestimmt werden, allerdings war der maximal erreichte Keimgehalt in der 54. LW geringfügig höher als in der 69. LW (s. Abb. 6).

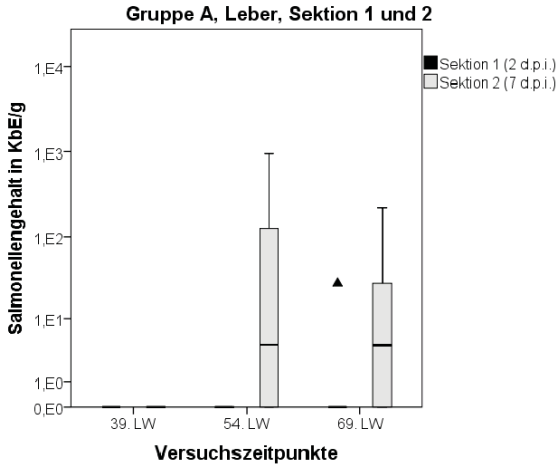


Abb. 6 **Boxplots zur log-Darstellung des Salmonellengehaltes der Leberproben.** Salmonellengehalt in KbE/g in den Leberproben zu den Versuchszeitpunkten 39., 54., 69. LW in den Sektionen 1 (schwarz) und 2 (grau) (2 und 7 Tage *p.inf.*) der Gruppe A. Der Median lag in den Sektionen 2 der 54. und 69. LW bei  $1,36 \times 10^1$  KbE/g, in den anderen Sektionen bei 0 KbE/g.

#### 4.3.1.6 Reproduktionsorgane

##### 4.3.1.6.1 Qualitative Auswertung

In den Legedärmen wurden zu keinem Zeitpunkt des Versuchs Salmonellen nachgewiesen. In der 69. LW, Sektion 2, waren 33,33% der Ovarien SE-positiv. Zu den anderen Entnahmezeitpunkten konnten keine Salmonellen in den Ovarien nachgewiesen werden (s. Anhang: Tab. 15-20).

##### 4.3.1.6.2 Quantitative Auswertung

Ein quantitativer SE-Nachweis war ausschließlich in dem Ovar eines Tieres (Tier 96) in der Sektion 2 der 69. LW möglich. Der Keimgehalt lag bei  $9,1 \times 10^1$  KbE/g (s. Anhang: Tab.20).

#### 4.3.2 Gruppe B

Gruppe B wurde dreimal mit MLV 2 (SE-Impfstamm: St 441/014, doppelt attenuiert (ade-/his-)) gegen SE und *S. Typhimurium* (STM) geimpft und anschließend einmal mit der Inaktivatvakzine (KV) KV 1 (SE-Impfstamm: St PT4) gegen SE.

##### 4.3.2.1 Klinische Beobachtungen

Bei den Tieren des ersten Versuchsdurchlaufes war keine klinische Symptomatik zu beobachten. In der 54. LW hatten die Tiere der Gruppe B nach der Infektion über einen

Zeitraum von zwei Tagen ggr. Durchfall. Bei der Einstallung zum Versuchsdurchlauf in der 69. LW wurde bei den Tieren 102, 72 und 68 eine mittelgradige (mgr.) Aszites diagnostiziert. Der Unterleib war umfangsvermehrt und bei Palpation war eine fluktuierende Flüssigkeit zu ertasten. Am sechsten Tag nach der Einstallung, einen Tag vor der Infektion, wurde Tier 72 tot aufgefunden. Die Todesursache konnte nicht geklärt werden.

#### **4.3.2.2 Ausscheidung des Infektionsstammes**

Ein Maximum der Ausscheidung des Infektionsstammes konnte in der 54. LW verzeichnet werden. In der 39. und 69. LW konnte ausschließlich am ersten Tag nach der Infektion in 8,33% bzw. 16,67% der untersuchten Kloakentupfer SE nachgewiesen werden. In der 54. LW waren zu den Beprobungszeitpunkten 1, 3 und 5 *p.inf.* 33,33%, 100% und 33,33% der Kloakentupfer SE-positiv (s. Anhang: Tab. 48-50).

#### **4.3.2.3 Pathologisch-anatomische Beobachtungen**

Die pathologischen Veränderungen der Tiere der Gruppe B waren überwiegend mit dem Reproduktionstrakt assoziiert. Drei Tiere hatten circa (ca.) 10-15 Zentimeter (cm) große mit seröser trüber Flüssigkeit gefüllte Blasen in der Bauchhöhle, die mit dem Ovidukt verbunden waren (54. LW: Tier 113 und 81 69. LW: Tier 99). Zum Teil hatten die Hennen freies Eigelb oder seröse Flüssigkeit in der Bauchhöhle. Tier 81 der 69. LW wies ein ca. walnussgroßes Gebilde aus undefinierbarem weiß-gelbem komprimiertem Material auf. Tier 101 der 69. LW fiel durch Kachexie, einen inaktiven Eierstock und einen insgesamt zurückgebildeten Reproduktionstrakt auf.

Am Darmkonvolut waren zum Teil ggr. fibrinöse Auflagerungen zu beobachten.

#### **4.3.2.4 Caecumwand und Caecuminhalt**

##### **4.3.2.4.1 Qualitative Auswertung**

Der prozentuale Anteil positiver Ergebnisse in Caecumwand und -inhalt war in der 54. LW (Sektionen 1 und 2) deutlich höher als zu den anderen Versuchszeitpunkten. Für den Caecuminhalt der Sektion 2 war dieser Unterschied signifikant (s. Abb. 7 B.).

Der Salmonellennachweis nahm von den Sektionen 1 zu den Sektionen 2 überwiegend ab. Besonders deutlich war diese Abnahme zum Versuchszeitpunkt 69. LW. Von der Sektion 1 (zwei Tage *p.inf.*) zur Sektion 2 (sieben Tage *p.inf.*) nahm der SE-Nachweis in Caecumwand und -inhalt von 40% auf 0% ab (s. Abb. 7).

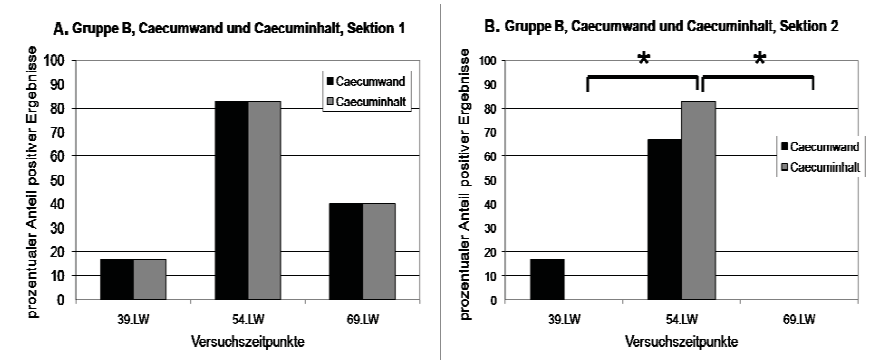


Abb. 7 **Balkendiagramm zur Darstellung qualitativ SE-positiver Caeca.** Salmonellen-positive Befunde (in %) in Caecumwand (schwarz) und Caecuminhalt (grau) der Gruppe B zu den Versuchszeitpunkten 39., 54. und 69. LW. **A. Sektion 1 (2 Tage *p.inf.*).** **B. Sektion 2 (7 Tage *p.inf.*):** In den Caecuminhalten der 54. LW waren signifikant häufiger Salmonellen nachzuweisen als in der 39. und 69. LW (\* $p < 0,05$ , Chi-Quadrat-Test).

#### 4.3.2.4.2 Quantitative Auswertung

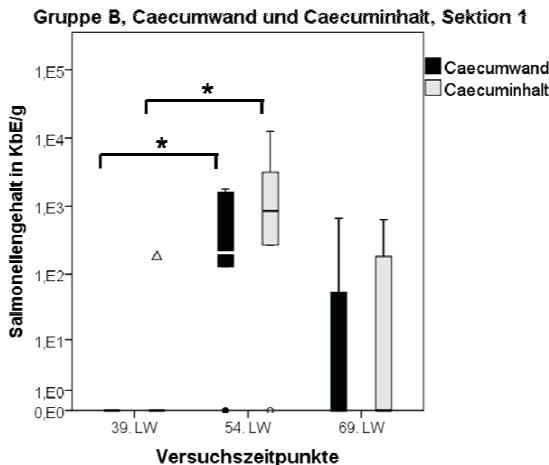


Abb. 8 **Boxplots zur log-Darstellung des Salmonellengehaltes der Caeca.** Salmonellengehalt in KbE/g in Caecumwand (schwarz) und Caecuminhalt (grau) der Gruppe B in der Sektion 1 (2 Tage *p.inf.*) zu den Versuchszeitpunkten 39., 54., 69. LW. Der Salmonellengehalt in den Caecumwänden und Caecuminhalten nahm von der 39. LW (Median= 0 KbE/g und 0 KbE/g) auf die 54. LW (Median=  $1,8 \times 10^2$  KbE/g und  $8,5 \times 10^2$  KbE/g) signifikant zu (\* $p < 0,05$ , Mann-Whitney-Test).

In Caecumwand und -inhalt der Sektionen 1 konnten in der 54. LW mehr Salmonellen nachgewiesen werden als in der 69. LW und signifikant mehr als in der 39. LW (s. Abb. 8).

Von den Sektionen 1 zu den Sektionen 2 nahm der SE-Nachweis zu jedem Versuchszeitpunkt ab. So war ein quantitativer SE-Nachweis in den Caeca der Sektionen 2 ausschließlich in der 54. LW möglich.

In der Sektion 1 (zwei Tage *p.inf*) konnten zu jedem Versuchszeitpunkt im Caecuminhalt mehr Salmonellen nachgewiesen werden als in der Caecumwand. In der Sektion 2 (54. LW) konnten jedoch in der Caecumwand (Median=  $7,25 \times 10^1$  KbE/g) mehr Salmonellen als im Caecuminhalt (Median= 0 KbE/g) nachgewiesen werden (s. Anhang: Tab. 24).

Zu beachten ist, dass sich die Ergebnisse der Sektion 1, 69. LW auf fünf anstatt sechs Tiere beziehen.

#### 4.3.2.5 Leber

##### 4.3.2.5.1 Qualitative Auswertung

In der 54. LW konnten in der Sektion 1 und Sektion 2 bei jeweils 50% der Tiere Salmonellen in der Leber nachgewiesen werden und damit insgesamt mehr als zu den anderen Versuchszeitpunkten. In der 39. LW wurden in der Sektion 1 keine Salmonellen nachgewiesen und in der Sektion 2 bei 50% der Tiere. In der 69. LW konnten in der Sektion 1 bei 40% der Tiere SE nachgewiesen werden, in der Sektion 2 war die Untersuchung der Leberproben vollständig SE-negativ (s. Abb. 9).

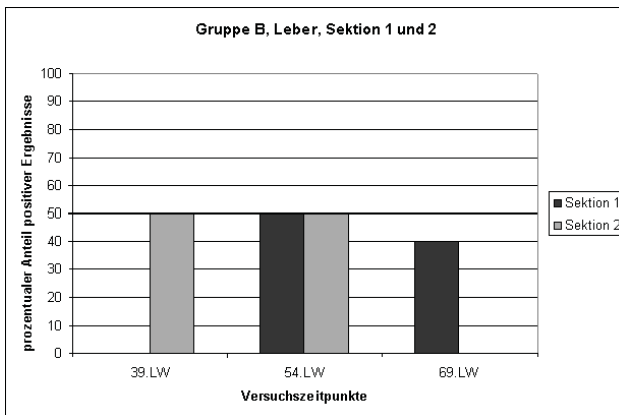


Abb. 9 **Balkendiagramm zur Darstellung qualitativ SE-positiver Leberproben.** Salmonellen-positive Befunde (in %) in den Leberproben der Sektionen 1 (schwarz) und 2 (grau) (2 und 7 Tage *p.inf*.) der Gruppe B zu den Versuchszeitpunkten 39., 54. und 69. LW.

#### **4.3.2.5.2 Quantitative Auswertung**

Die quantitative Untersuchung der Leberproben der Gruppe B ergab wie für die Caeca einen maximalen Salmonellennachweis in der 54. LW. In der Sektion 1 konnte bei drei Tieren ein Salmonellengehalt (Median= 4,5 KbE/g) und in der Sektion 2 bei einem Tier ein Gehalt von  $1,8 \times 10^1$  KbE/g bestimmt werden. In der 39. LW konnten in keiner Sektion Salmonellen quantitativ nachgewiesen werden. In der 69. LW konnte ausschließlich bei einem Tier in der Sektion 1 ein Salmonellengehalt von  $9,0 \times 10^0$  KbE/g erfasst werden (s. Anhang: Tab. 23 und 24).

Zu beachten ist, dass sich die Ergebnisse der Sektion 1, 69. LW auf fünf anstatt sechs Tiere beziehen.

#### **4.3.2.6 Reproduktionsorgane**

##### **4.3.2.6.1 Qualitative Auswertung**

Im Ovidukt von 16,67% der Tiere der Sektion 2, 69. LW, und im Ovar von 16,67% der Tiere der Sektion 2, 39. LW, wurden Salmonellen qualitativ nachgewiesen (s. Anhang: Tab. 21-26).

##### **4.3.2.6.2 Quantitative Auswertung**

In den Eierstöcken war zu keinem Zeitpunkt SE in den Direktausstrichen nachzuweisen. In dem Legedarm eines Tieres (Tier 101, 69. LW, Sektion 2), das bereits in der pathologisch-anatomischen Untersuchung auffiel, wurde ein Salmonellengehalt von  $4,64 \times 10^2$  KbE/g bestimmt (s. Anhang: Tab. 21-26).

#### **4.3.3 Gruppe C**

Gruppe C wurde dreimal mit MLV 1 (SE-Impfstamm: attenuiertes Sm/Rif12/Ssq.) gegen SE und zweimal mit MLV 3 (STM-Impfstamm: St Nal2/Rif9/RH) gegen STM geimpft.

##### **4.3.3.1 Klinische Beobachtungen**

Während der drei Versuchszeiträume waren zu keinem Zeitpunkt klinische Symptome einer Salmonellose oder einer anderen Krankheit aufgetreten. Die Tiere der 54. LW zeigten ein ausgeprägtes Hackverhalten. Tier 78 hatte einen kahlen Kopf mit Schwellungen und zum Teil blutverkrusteten Wunden, Tier 77 wies einen kahlen Hals mit Hackspuren auf. Während der täglichen Beobachtungszeiträume wurden diese Tiere von den anderen gejagt und gepickt. Sie hielten sich vermehrt im Legenest auf.

#### 4.3.3.2 Ausscheidung des Infektionsstammes

Der Anteil ausscheidender Tiere war zum Versuchszeitpunkt 54. LW am größten. Einen Tag nach der Infektion waren 33,33% der Kloakentupfer Salmonellen-positiv, zwei Tage später stieg der prozentuale Anteil auf 83,33% und sank dann auf 0% fünf Tage *p.inf.*. In der 39. LW konnten ausschließlich zum Beprobungszeitpunkt einen Tag nach der Infektion bei 16,67% der Tiere Salmonellen in der Kloake nachgewiesen werden. In der 69. LW waren zu keinem Zeitpunkt Salmonellen in den Kloakentupfern nachzuweisen (s. Anhang: Tab. 51-53).

#### 4.3.3.3 Pathologisch-anatomische Beobachtungen

Wie in Gruppe B lagen auch in Gruppe C insbesondere pathologische Veränderungen des Reproduktionstraktes vor. Tier 77 (39. LW) hatte freien Eiinhalt in der Bauchhöhle. Tier 74 (69. LW) war mgr. kachektisch und hatte einen zurückgebildeten, kaum auffindbaren Reproduktionstrakt. Tier 105 (69. LW) war hochgradig kachektisch, der Legedarm enthielt mehrere Eier in Anbildung und war mit massiven Verklebungen versehen, was auf eine Legenot schließen lässt. Der Eierstock war zurückgebildet.

Die klinisch auffälligen Tiere 77 und 78 (54. LW) waren kachektisch. Beim Anschnitt der Schwellungen am Kopf von Tier 78 zeigte sich eine weiß-gelbliche Masse von pastöser Konsistenz.

#### 4.3.3.4 Caecumwand und Caecuminhalt

##### 4.3.3.4.1 Qualitative Auswertung

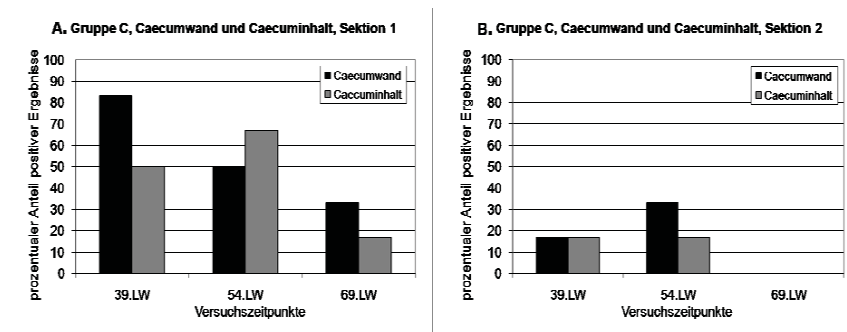


Abb. 10 Balkendiagramm zur Darstellung qualitativ SE-positiver Caeca. Salmonellen-positive Befunde (in %) in Caecumwand (schwarz) und Caecuminhalt (grau) der Gruppe C zu den Versuchszeitpunkten 39., 54. und 69. LW. A. Sektion 1 (2 Tage *p.inf.*). B. Sektion 2 (7 Tage *p.inf.*)



In der 69. LW (Sektion 1 und 2) konnten in Caecumwand und –inhalt weniger Salmonellen nachgewiesen werden als zu den vorhergehenden Versuchszeitpunkten.

Zwischen der 39. und 54. LW unterschied sich der Salmonellennachweis nicht wesentlich, wenn man die Ergebnisse von Sektion 1 und 2 sowie Caecumwand und –inhalt insgesamt betrachtet.

Zu jedem Versuchszeitpunkt nahm der SE-Nachweis in Caecumwand und -inhalt von der Sektion 1 zur Sektion 2 ab (s. Abb. 10 A. und B.).

#### 4.3.3.4.2 Quantitative Auswertung

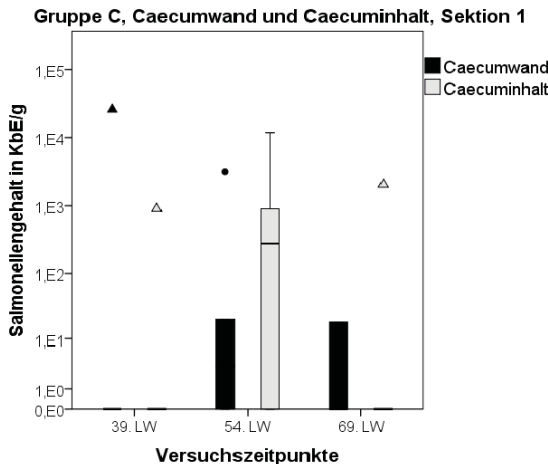


Abb. 11 **Boxplots zur log-Darstellung des Salmonellengehaltes der Caeca.** Salmonellengehalt in KbE/g in Caecumwand (schwarz) und Caecuminhalt (grau) der Gruppe C in der Sektion 1 (2 Tage *p.inf.*) zu den Versuchszeitpunkten 39., 54., 69. LW. Der Median lag für die Caecumwand in der 54. LW bei 9,0 KbE/g und für Caecuminhalt bei  $2,72 \times 10^2$  KbE/g. Zu den anderen Versuchszeitpunkten lag der Median bei 0 KbE/g.

Die quantitative Untersuchung der Caeca der Sektionen 1 ergab in der 54. LW die höchsten Keimgehalte. Zu den Versuchszeitpunkten 39. und 69. LW konnten jeweils nur bei einem bzw. zwei Tieren Salmonellen in Caecumwand bzw. -inhalt quantitativ bestimmt werden (s. Abb. 11). Damit korrelieren die Ergebnisse nicht mit den Ergebnissen der qualitativen Untersuchung.

Von Sektion 1 zu Sektion 2 nahm der Salmonellennachweis zu allen Versuchszeitpunkten ab. Nur vereinzelt konnten sieben Tage *p.inf.* in Caecumwand oder Caecuminhalt der Tiere SE nachgewiesen werden (s. Anhang: Tab. 28, 30, 32).

#### 4.3.3.5 Leber

##### 4.3.3.5.1 Qualitative Auswertung

Die Ergebnisse der Sektionen 1 beschreiben einen maximalen SE-Nachweis in der 39. LW und dann mit dem Alter der Legehennen eine Abnahme des Salmonellen-Nachweises.

Im Gegensatz dazu konnten in der Sektion 2 der 39. LW weniger Salmonellen als zu den anderen Versuchszeitpunkten nachgewiesen werden. In der Sektion 2 der 54. LW konnten mehr Salmonellen nachgewiesen werden als in der Sektion 2 der 69. LW und signifikant mehr als in der Sektion 2 der 39. LW (s. Abb. 12).

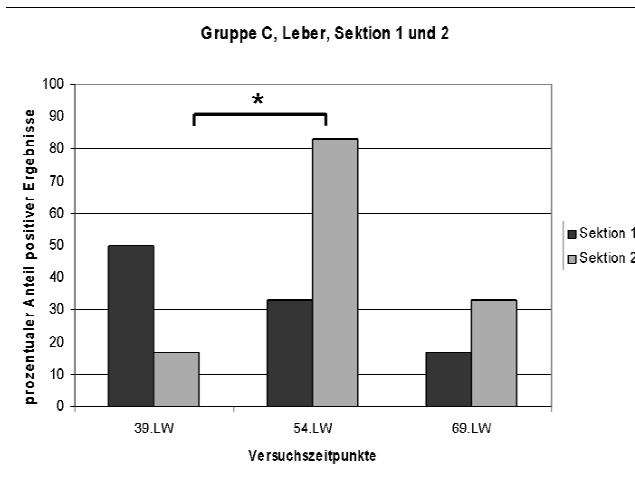


Abb. 12 **Balkendiagramm zur Darstellung qualitativer SE-positiver Leberproben.** Salmonellen-positive Befunde (in %) in den Leberproben der Sektionen 1 (schwarz) und 2 (grau) (2 und 7 Tage *p.inf.*) der Gruppe C zu den Versuchszeitpunkten 39., 54. und 69. LW. In den Leberproben der Sektion 2 der 54. LW waren signifikant häufiger Salmonellen nachzuweisen als in den Leberproben der Sektion 2 der 39. LW (\* $p < 0,05$ , Chi-Quadrat-Test).

##### 4.3.3.5.2 Quantitative Auswertung

In den Leberproben waren zum Versuchszeitpunkt 54. LW (Sektion 1 und 2) die höchsten Salmonellengehalte nachzuweisen. In der Sektion 2 der 54. LW (Median=  $1,5 \times 10^2$  KbE/g) war der Keimgehalt signifikant höher als in der Sektion 2 der 39. LW. In der 39. LW waren weder in Sektion 1 noch 2 Salmonellen quantitativ nachzuweisen. In der 69. LW konnten ausschließlich in der Sektion 2 bei zwei Tieren Salmonellen quantitativ nachgewiesen werden (Median= 0 KbE/g) (s. Abb. 1).

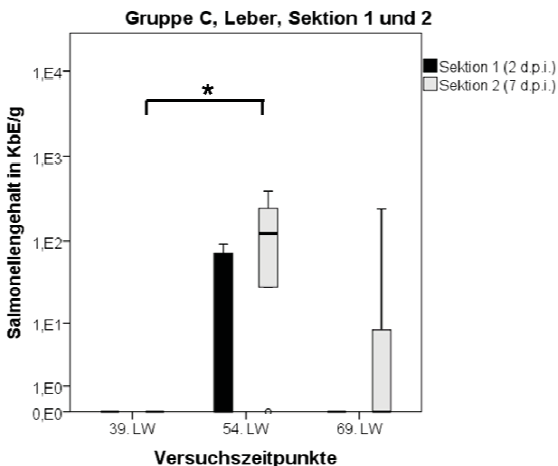


Abb. 1 **Boxplots zur log-Darstellung des Salmonellengehaltes der Leberproben.** Salmonellengehalt in KbE/g in den Leberproben zu den Versuchszeitpunkten 39., 54., 69. LW in den Sektionen 1 (schwarz) und 2 (grau) (2 und 7 Tage *p.inf.*) der Gruppe C. Der Median lag in der Sektion 2 der 54. LW bei  $1,5 \times 10^2$  KbE/g, in den anderen Sektionen bei 0 KbE/g. In der Sektion 2 der 54. LW war ein signifikant höherer Salmonellengehalt nachzuweisen als in der Sektion 2 der 39. LW (\* $p < 0,05$ , Mann-Whitney-Test).

#### 4.3.3.6 Reproduktionsorgane

##### 4.3.3.6.1 Qualitative Auswertung

In der 54. LW waren in der Sektion 1 und 2 jeweils 16,67% der Tiere im Ovar Salmonellenpositiv. In den Ovidukten konnten keine Salmonellen nachgewiesen werden (s. Anhang: Tab.27-32).

##### 4.3.3.6.2 Quantitative Auswertung

In den Ovidukten wurde zu keinem der drei Versuchszeitpunkte SE auf den Direktausstrichen nachgewiesen. In den Ovarien konnten ausschließlich zum Versuchszeitpunkt 54. LW in den Sektionen 1 und 2 bei jeweils einem Tier Salmonellen quantitativ nachgewiesen werden (Tier 77=  $1,8 \times 10^1$  KbE/g, Tier 104=  $2,72 \times 10^2$  KbE/g) (s. Anhang: Tab. 29 und 30).

#### 4.3.4 Gruppe D

Gruppe D wurde dreimal mit MLV 1 gegen SE (SE-Impfstamm: attenuiertes Sm/Rif12/Ssq.) und anschließend einmalig mit KV 2 (SE-Impfstamm: St PT4, STM-Impfstamm: St DT 104) gegen SE und STM geimpft.

#### 4.3.4.1 Klinische Beobachtungen

Die Tiere der Gruppe D waren während der drei Versuchsdurchläufe klinisch unauffällig.

#### 4.3.4.2 Ausscheidung des Infektionsstammes

Die Untersuchung der Kloakentupfer der 54. LW ergab den größten prozentualen Anteil SE-ausscheidender Tiere. In der 39. LW waren zu den Beprobungszeitpunkten ein und drei Tage nach der Infektion 33,33% der Kloakentupfer Salmonellen-positiv, fünf Tage nach der Infektion waren keine Salmonellen mehr nachzuweisen. In der 54. LW stieg der prozentuale Anteil positiver Ergebnisse vom ersten Tag *p.inf.* mit 16,67% auf 66,67% am dritten und fünften Tag *p.inf.*. In der 69. LW nahm der Salmonellennachweis von 33,33% am ersten Tag *p.inf.* bis auf 16,67% am dritten und fünften Tag *p.inf.* ab. Die Einzeltiere schieden SE diskontinuierlich aus. Einige Tiere schieden am ersten und fünften Tag *p.inf.* Salmonellen aus, die Kloakentupfer drei Tage *p.inf.* waren jedoch negativ (s. Anhang: Tab. 54-56).

#### 4.3.4.3 Pathologisch-anatomische Beobachtungen

Bei den pathologisch-anatomischen Untersuchungen zum Versuchszeitpunkt 69. LW fiel Tier 84 durch freie Flüssigkeit in der Bauchhöhle und ein zurückgebildetes Ovar auf. Tier 110 wies ein sehr kleines, kaum auffindbares Ovidukt und ein zurückgebildetes Ovar auf.

#### 4.3.4.4 Caecumwand und Caecuminhalt

##### 4.3.4.4.1 Qualitative Auswertung

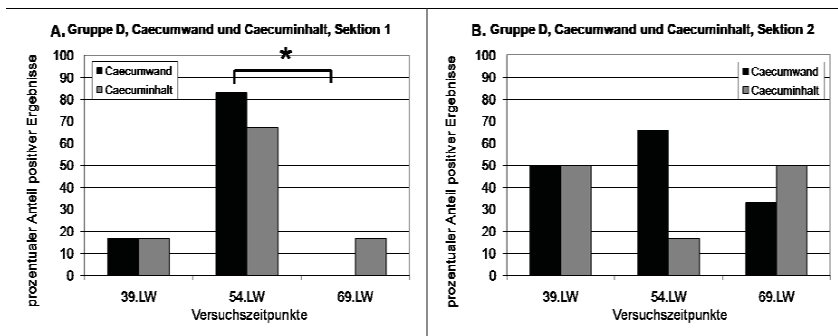


Abb. 2 **Balkendiagramm zur Darstellung qualitativ SE-positiver Caeca.** Salmonellen-positive Befunde (in %) in Caecumwand (schwarz) und Caecuminhalt (grau) der Gruppe D zu den Versuchszeitpunkten 39., 54. und 69. LW. **A. Sektion 1 (2 Tage *p.inf.*):** In den Caecumwänden der 54. LW waren signifikant häufiger Salmonellen nachzuweisen als in den Caecumwänden der 69. LW (\* $p < 0,05$ , Chi-Quadrat-Test). **B. Sektion 2 (7 Tage *p.inf.*)**

Am häufigsten konnte SE in Caecumwand und –inhalt in der Sektion 1 der 54. LW nachgewiesen werden. In der Caecumwand (Sektion 1) war der Nachweis zu diesem Versuchszeitpunkt signifikant höher als in der Sektion 1 der 69. LW (s. Abb. 2 A.).

In der 39. und 69. LW nahm der SE-Nachweis in Caecumwand und –inhalt von der Sektion 1 zur Sektion 2 um jeweils 33,33% zu. In der 54. LW jedoch nahm der SE-Nachweis von der Sektion 1 zur Sektion 2 in der Caecumwand um 16,66% und im Caecuminhalt um 50% ab, so dass sich die Ergebnisse der Sektionen 2 zwischen den Versuchszeitpunkten angleichen (s. Abb. 2 B.).

#### 4.3.4.4.2 Quantitative Auswertung

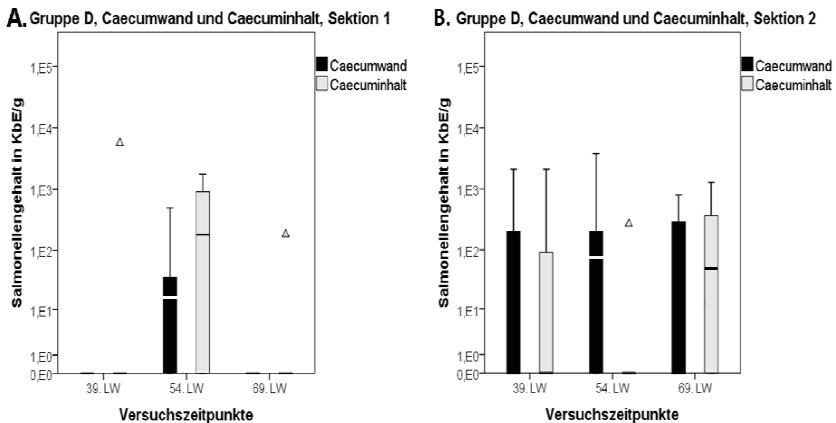


Abb. 3 **Boxplots zur log-Darstellung des Salmonellengehaltes der Caeca.** Salmonellengehalt in KbE/g in Caecumwand (schwarz) und Caecuminhalt (grau) der Gruppe D zu den Versuchszeitpunkten 39., 54., 69. LW. **A. Sektion 1 (2 Tage *p.inf.*):** Der Median lag für Caecumwand in der Sektion 1, 54. LW bei  $1,9 \times 10^1$  KbE/g und für Caecuminhalt bei  $2,25 \times 10^2$  KbE/g. Zu den anderen Versuchszeitpunkten lag der Median der Sektion 1 bei 0 KbE/g. **B. Sektion 2 (7 Tage *p.inf.*):** Die Mediane zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten lagen außer in der 54. LW für Caecumwand (Median=  $9,9 \times 10^1$  KbE/g) und in der 69. LW für Caecuminhalt (Median=  $9,1 \times 10^1$  KbE/g) bei 0 KbE/g.

Von den Sektionen 1 konnten zum Versuchszeitpunkt 54. LW die höchsten Salmonellengehalte nachgewiesen werden (Mediane: Caecumwand=  $1,9 \times 10^1$  KbE/g und Caecuminhalt=  $2,25 \times 10^1$  KbE/g). In den Sektionen 1 der 39. und 69. LW konnte bei jeweils nur einem Tier ein Keimgehalt im Caecuminhalt ermittelt werden (Mediane: Caecumwand und Caecuminhalt= 0 KbE/g).

Von Sektion 1 zu Sektion 2 nahm der Salmonellengehalt zu den Versuchszeitpunkten 39. und 69. LW in Caecumwand und –inhalt zu. In der 54. LW nahm der Salmonellengehalt im

Caecuminhalt jedoch deutlich ab (Median= 0 KbE/g). Entsprechend glichen sich die Ergebnisse der Salmonellengehalte in den Caeca zwischen den drei Versuchszeitpunkten zur Sektion sieben Tage *p.inf.* an. Die Ergebnisse sind in Abb. 3 grafisch dargestellt.

#### 4.3.4.5 Leber

##### 4.3.4.5.1 Qualitative Auswertung

Die qualitativen Untersuchungen der Leberproben ergaben zu den drei Versuchszeitpunkten (Sektion 1 und 2) fast identische Ergebnisse. Zu jedem Versuchszeitpunkt konnten in der Sektion 1 bei 16,67% der Tiere SE nachgewiesen werden. In der 39. und 54. LW nahm der SE-Nachweis zur Sektion 2 auf 66,67% zu. In der 69. LW war eine Zunahme von Sektion 1 zu Sektion 2 auf 50% positive Lebern sieben Tage *p.inf.* zu verzeichnen (s. Abb. 4).

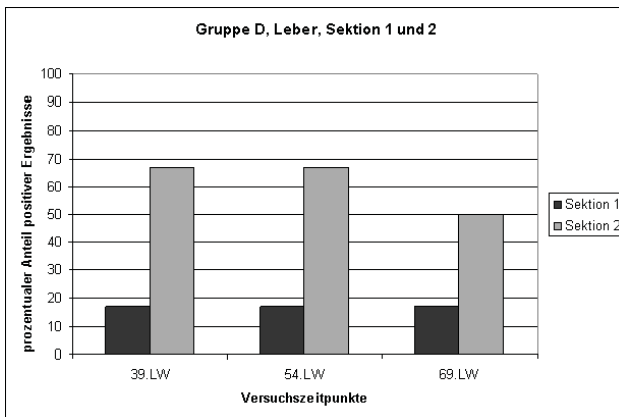


Abb. 4 **Balkendiagramm zur Darstellung qualitativer SE-positiver Leberproben.** Salmonellen-positive Befunde (in %) in den Leberproben der Sektionen 1 (schwarz) und 2 (grau) (2 und 7 Tage *p.inf.*) der Gruppe D zu den Versuchszeitpunkten 39., 54. und 69. LW.

##### 4.3.4.5.2 Quantitative Auswertung

Die quantitative Untersuchung der Leberproben ergab einen maximalen SE-Nachweis in der Sektion 2 der 39. LW (Median=  $8,2 \times 10^1$  KbE/g). In der 54. und 69. LW waren die ermittelten Salmonellenzahlen der Sektionen 2 (Median= 0 KbE/g) etwa identisch.

In den Sektionen 1 konnte nur zum Versuchszeitpunkt 54. LW bei einem Tier SE quantitativ nachgewiesen werden (s. Abb. 5).

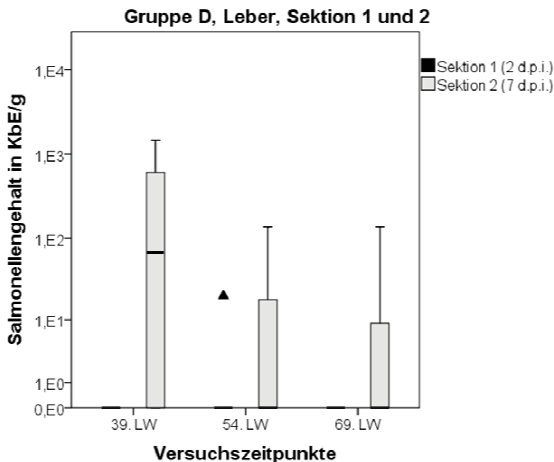


Abb. 5 **Boxplots zur log-Darstellung des Salmonellengehaltes der Leberproben.** Salmonellengehalt in KbE/g in den Leberproben zu den Versuchszeitpunkten 39., 54., 69. LW in den Sektionen 1 (schwarz) und 2 (grau) (2 und 7 Tage *p.inf.*) der Gruppe D. Der Median lag in der Sektion 2 der 39. LW bei  $8,2 \times 10^1$  KbE/g, in den anderen Sektionen bei 0 KbE/g.

#### 4.3.4.6 Reproduktionsorgane

##### 4.3.4.6.1 Qualitative Auswertung

In den Sektionen 1 und 2 der 54. und 69. LW konnte bei jeweils 16,67% der Tiere SE im Eierstock nachgewiesen werden. Die Ovidukte aller Tiere und die Ovarien zum Versuchszeitpunkt 39. LW waren SE-negativ (s. Anhang: Tab. 33-38).

##### 4.3.4.6.2 Quantitative Auswertung

Ein quantitativer Salmonellennachweis war nur für das Ovar eines Tieres in der Sektion 2 der 54. LW möglich (Tier 100= 9,0 KbE/g). Die Direktausstriche der restlichen Ovarien und Ovidukte waren SE-negativ (s. Anhang: Tab. 33-38).

#### 4.3.5 Gruppe E

Gruppe E wurde dreimal mit MLV 1 (SE-Impfstamm: attenuiertes Sm/Rif12/Ssq.) gegen SE, zweimal mit MLV 3 (STM-Impfstamm: St Nal2/Rif9/RH) gegen STM und anschließend einmalig mit KV 2 (SE-Impfstamm: St PT4, STM-Impfstamm: St DT 104) gegen SE und STM geimpft.

#### 4.3.5.1 Klinische Beobachtungen

Zu den Versuchszeitpunkten 39. und 54. LW konnten bei den Tieren keine klinischen Auffälligkeiten festgestellt werden. Im letzten Versuchsdurchgang hatten die Tiere 88, 90 und 87 blutige Wunden an den Kloaken. Tier 120 wurde am vierten Tag nach der Infektion tot aufgefunden, die Todesursache konnte nicht geklärt werden.

#### 4.3.5.2 Ausscheidung des Infektionsstammes

In der 39. LW konnten zum Zeitpunkt einen Tag nach der Infektion mit 75% positiven Befunden die meisten Salmonellen-Ausscheider erfasst werden. Drei Tage *p.inf.* konnte bei 50% und fünf Tage *p.inf.* bei keinem der Tiere SE in den Kloakentupfern nachgewiesen werden. In der 54. LW wurden ein, drei und fünf Tage *p.inf.* 16,67%, 50% und 16,67% SE-positive Kloakentupfer gefunden. In der 69. LW war ausschließlich zu den Entnahmezeitpunkten ein und drei Tage *p.inf.* bei jeweils 16,67% der Tiere SE nachzuweisen (s. Anhang: Tab. 57-59).

#### 4.3.5.3 Pathologisch-anatomische Beobachtungen

Die Tiere der 39. und 54. LW wiesen keine pathologischen Veränderungen auf. Tier 118 (69. LW) fiel aufgrund hochgradiger Verwachsungen in der gesamten Bauchhöhle und einer Hepatomegalie auf.

#### 4.3.5.4 Caecumwand und Caecuminhalt

##### 4.3.5.4.1 Qualitative Auswertung

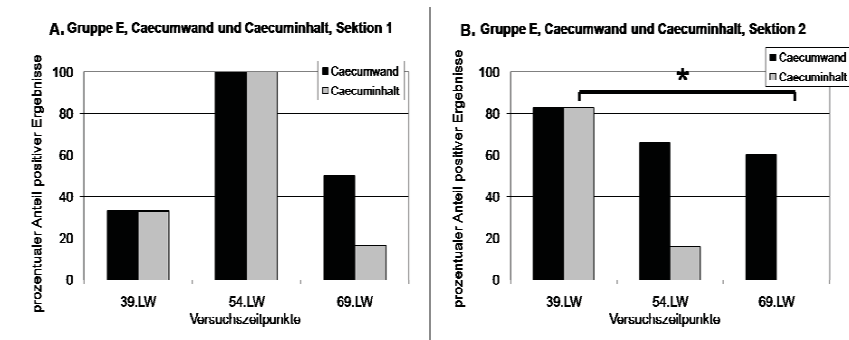


Abb. 6 **Balkendiagramm zur Darstellung qualitativ SE-positiver Caeca.** Salmonellen-positive Befunde (in %) in Caecumwand (schwarz) und Caecuminhalt (grau) der Gruppe E zu den Versuchszeitpunkten 39., 54. und 69. LW. **A. Sektion 1 (2 Tage *p.inf.*).** **B. Sektion 2 (7 Tage *p.inf.*):** In den Caecuminhalten der 39. LW waren signifikant mehr Salmonellen nachzuweisen als in den Caecuminhalten der 69. LW (\*p<0,05, Chi-Quadrat-Test).



In der Sektion 1 der 54. LW konnten in allen Caecumwand- und Caecuminhaltproben Salmonellen nachgewiesen werden und damit mehr als in den Sektionen 1 der 39. und 69. LW.

Von Sektion 1 zu Sektion 2 stieg der SE-Nachweis in der 39. LW in Caecumwand und -inhalt um jeweils 50% an. In der 54. LW nahm der SE-Nachweis in der Caecumwand um 16,67% und im Caecuminhalt um 83,33% ab. In der 69. LW nahm er in der Caecumwand geringfügig zu und im Caecuminhalt auf 0% ab. Damit waren in der Sektion 2 der 39. LW mehr Salmonellen in den Caeca nachzuweisen, als in den Sektionen 2 der anderen Versuchszeitpunkte. Der Unterschied des SE-Nachweises im Caecuminhalt zwischen den Sektionen 2 der 39. und 69. LW ist signifikant (s. Abb. 6).

#### 4.3.5.4.2 Quantitative Auswertung

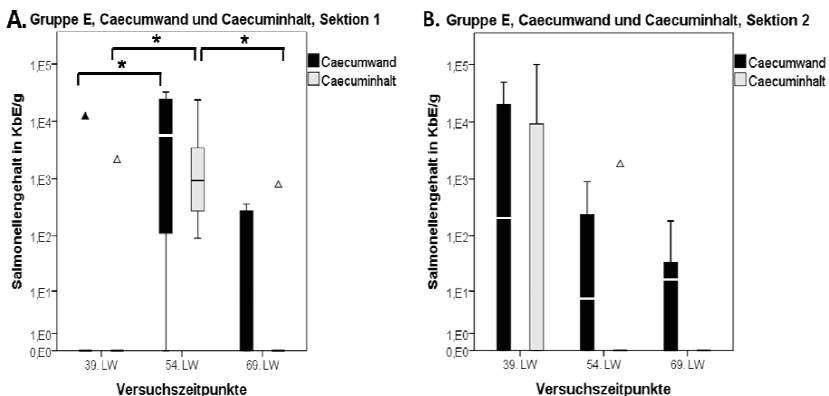


Abb. 7 **Boxplots zur log-Darstellung des Salmonellengehaltes der Caeca**. Salmonellengehalt in KbE/g in Caecumwand (schwarz) und Caecuminhalt (grau) der Gruppe E zu den Versuchszeitpunkten 39., 54., 69. LW. **A. Sektion 1 (2 Tage p.inf.):** Die Mediane der 54. LW betrugen für die Caecumwand  $6,42 \times 10^3$  KbE/g und für den Caecuminhalt  $1,36 \times 10^3$  KbE/g. Die Caecumwände der 54. LW waren mit signifikant mehr Salmonellen besiedelt als die Caecumwände der 39. LW (\* $p < 0,05$ , Mann-Whitney-Test). In den Caecumgehalten der 54. LW waren signifikant mehr Salmonellen nachzuweisen als in den Caecumgehalten der 39. und 69. LW (\* $p < 0,05$ , Mann-Whitney-Test). **B. Sektion 2 (7 Tage p.inf.)**

Der SE-Nachweis in den Caeca der Gruppe E war in der Sektion 1 der 54. LW maximal. In den Caecuminhalt- und Caecumwandproben konnten signifikant mehr Salmonellen nachgewiesen werden als in der Sektion 1 der 39. LW. Zudem konnten in der Caecumwand mehr und im Caecuminhalt signifikant mehr Salmonellen nachgewiesen werden als in der Sektion 1 der 69. LW.

In der 39. LW nahm der Salmonellengehalt von der Sektion 1 zur Sektion 2 in Caecumwand und –inhalt zu. In der 54. und 69. LW nahm der Salmonellengehalt ab. Damit waren die Caeca sieben Tage *p.inf.* (Sektion 2) in der 39. LW stärker mit SE belastet als in der 54. und 69.LW.

Zu jedem Versuchszeitpunkt war der Salmonellengehalt in den Sektionen 2 in der Caecumwand höher als im Caecuminhalt.

Zu beachten ist, dass sich die Ergebnisse der Sektion 2, 69. LW, auf fünf anstatt sechs Tiere beziehen.

#### 4.3.5.5 Leber

##### 4.3.5.5.1 Qualitative Auswertung

Zum Versuchszeitpunkt 54. LW konnten in der Sektion 1 mehr Salmonellen nachgewiesen werden als in der Sektion 1 der 69. LW und signifikant mehr als in der Sektion 1 der 39. LW. In der 39. und 69. LW nahm der SE-Nachweis von der Sektion 1 auf die Sektion 2 zu, in der 54. LW jedoch ab. Die Zunahme des SE-Nachweises in der 39. LW von 0 auf 100% war signifikant. Damit war der Salmonellennachweis in der Sektion 2 der 39. LW höher als in der Sektion 2 der 54. und 69. LW (s. Abb. 8).

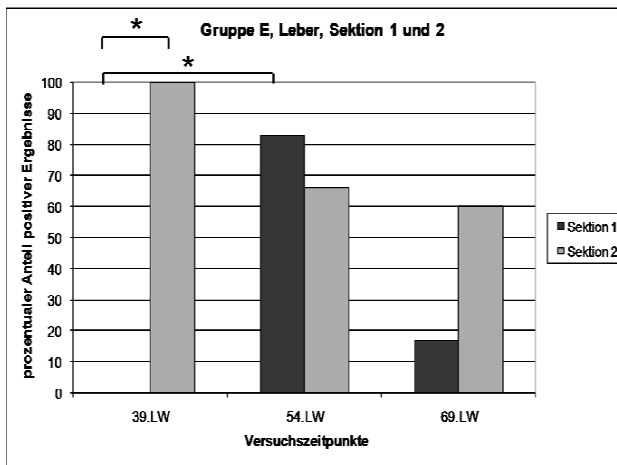


Abb. 8 **Balkendiagramm zur Darstellung SE-positiver Leberproben.** Salmonellen-positive Befunde (in %) in den Leberproben der Sektionen 1 (grau) und 2 (schwarz) (2 und 7 Tage *p.inf.*) der Gruppe E zu den Versuchszeitpunkten 39., 54. und 69. LW. In der Sektion 1 der 54. LW waren in den Lebern signifikant häufiger Salmonellen nachzuweisen als in den Lebern der Sektion 1 der 39. LW (\* $p < 0,05$ , Chi-Quadrat-Test). In der 39. LW lag eine signifikante Zunahme des Salmonellennachweises von Sektion 1 zu Sektion 2 vor (\* $p < 0,05$ , Chi-Quadrat-Test).

#### 4.3.5.5.2 Quantitative Auswertung

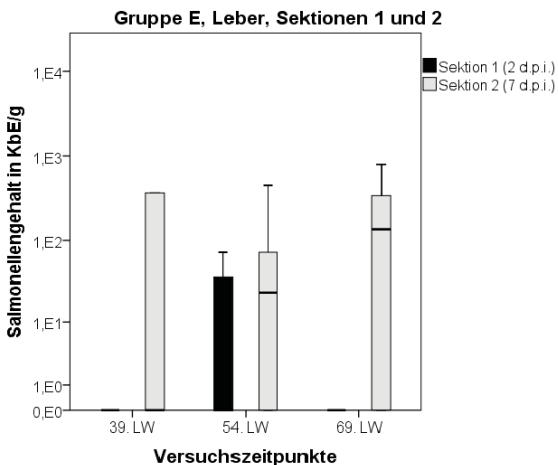


Abb. 9 **Boxplots zur log-Darstellung des Salmonellengehaltes der Leberproben.** Salmonellengehalt in KbE/g in den Leberproben zu den Versuchszeitpunkten 39., 54., 69. LW in den Sektionen 1 (schwarz) und 2 (grau) (2 und 7 Tage *p.inf.*) der Gruppe E. Der Median lag in der Sektion 2 der 54. LW bei  $6,73 \times 10^1$  KbE/g und der 69. LW bei  $1,36 \times 10^2$  KbE/g. In den anderen Sektionen lag der Median bei 0 KbE/g.

In der Sektion 1 der 54. LW wurden mehr Salmonellen nachgewiesen als in den Sektionen 1 der 39. und 69. LW.

Die Ergebnisse der Sektionen 2 beschreiben eine Zunahme des SE-Nachweises von der 39. LW (Median= 0 KbE/g) auf die 54. LW (Median=  $6,37 \times 10^1$  KbE/g) und 69. LW (Median=  $1,36 \times 10^2$  KbE/g) (s. Abb. 9).

Zu beachten ist, dass sich die Ergebnisse der Sektion 2, 69. LW, auf fünf anstatt sechs Tiere beziehen.

#### 4.3.5.6 Reproduktionsorgane

##### 4.3.5.6.1 Qualitative Auswertung

Bei 40% der Tiere der Sektion 2 der 69. LW und bei 16,67% der Tiere der Sektion 2 der 39. LW konnte SE im Ovar qualitativ nachgewiesen werden. Die Ovidukte insgesamt und die Ovarien der anderen Tiere waren SE-negativ (s. Anhang: Tab. 39-44).

##### 4.3.5.6.2 Quantitative Auswertung

Ein quantitativer Salmonellennachweis war ausschließlich in den Ovarien von zwei Tieren in der Sektion 2 der 69. LW möglich (Tier 115=  $2,72 \times 10^1$  KbE/g, Tier 119=  $1,79 \times 10^3$  KbE/g).

Bis auf die Direktausstriche dieser Ovarien konnten keine Salmonellen auf den Direktausstrichen von Ovar und Ovidukt nachgewiesen werden (s. Anhang: Tab. 39-44).

## 4.4 Ergebnisse der Gruppen im Vergleich

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Gruppen A (LV 1) und D (LV 1 + KV 2) bzw. C (LV 1 + LV 3) und E (LV 1 + LV 3 + KV 2) im Vergleich dargestellt und Unterschiede zwischen den Gruppen aufgezeigt.

### 4.4.1 Vergleich der Gruppen A und D

#### 4.4.1.1 Ausscheidung des Infektionsstammes

Für den Vergleich der Ausscheidung des Infektionsstammes zwischen den Impfgruppen wurde die Anzahl positiver Kloakentupfer der drei Beprobungszeitpunkte eines Versuchszeitpunktes zusammengefasst und statistisch gegeneinander ausgewertet.

Zu jedem Zeitpunkt schieden die Tiere der Gruppe D den Infektionsstamm häufiger aus als die Tiere der Gruppe A. In der 39. und 54. LW war der prozentuale Anteil SE-positiver Kloakentupfer in Gruppe D signifikant höher (s. Abb. 10).

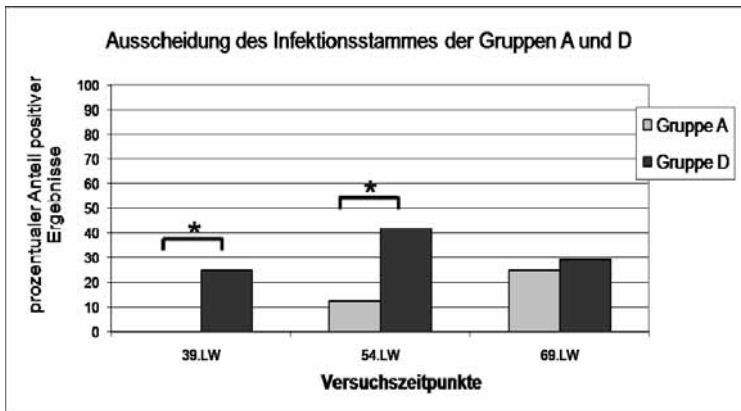


Abb. 10 **Balkendiagramm zur Darstellung qualitativ SE-positiver Kloakentupfer.** Salmonellen-positive Befunde (in %) in den Kloakentupfern der Versuchsgruppen A (grau) und D (schwarz) zu den Versuchszeitpunkten 39., 54. und 69. LW. \*, signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ( $p < 0,05$ , Chi-Quadrat-Test).

#### 4.4.1.2 Caecumwand und Caecuminhalt

##### 4.4.1.2.1 Qualitative Auswertung

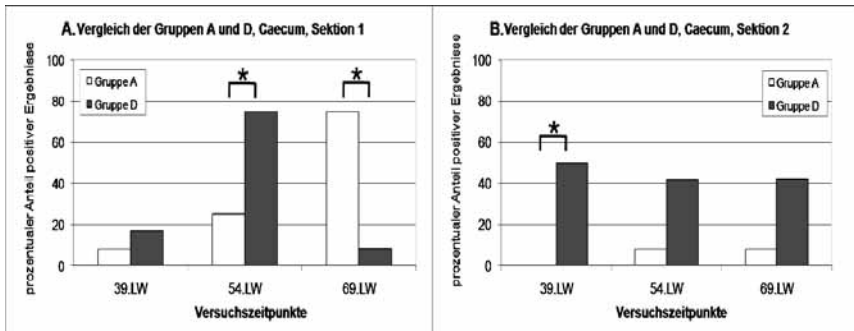


Abb. 11 Balkendiagramm zur Darstellung qualitativ SE-positiver Caeca. Salmonellen-positive Befunde (in %) in den Gruppen A (grau) und D (schwarz) zu den Versuchszeitpunkten 39., 54. und 69. LW. **A. Sektion 1 (2 Tage *p.inf.*).** **B. Sektion 2 (7 Tage *p.inf.*).**\*, signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ( $p < 0,05$ , Chi-Quadrat-Test).

Um das Ausmaß der Salmonellenbesiedelung des Caecums zwischen den Gruppen vergleichen zu können, wurden die für Caecumwand und Caecuminhalt erhobenen Daten einer Sektion zusammengefasst und auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen geprüft.

In der Sektion 1 der 39. LW unterschied sich der qualitative SE-Nachweis in den Gruppen A und D geringfügig. In der Sektion 1, 54. LW, konnten in Gruppe D jedoch signifikant häufiger Salmonellen nachgewiesen werden als in Gruppe A. In der 69. LW hingegen waren in den Caeca der Gruppe A signifikant häufiger Salmonellen nachzuweisen als in den Caeca der Gruppe D (s. Abb. 11 A.).

In den Sektionen 2 waren zu jedem Versuchszeitpunkt in Gruppe D mehr Salmonellen in den Caeca nachzuweisen als in Gruppe A. In der 39. LW war die Nachweisrate signifikant höher (s. Abb. 11 B.).

##### 4.4.1.2.2 Quantitative Auswertung

In der Sektion 1 der 39. LW konnten nur bei einem Tier der Gruppe D Salmonellen quantitativ nachgewiesen werden, bei den Tieren der Gruppe A waren keine Salmonellen in Caecumwand und -inhalt quantitativ nachzuweisen. In der Sektion 1, 54. LW, war der Salmonellengehalt in Gruppe D signifikant höher als in Gruppe A. In der 69. LW hingegen war der Salmonellengehalt in Gruppe A signifikant höher (s. Abb. 12 A.).

Wie die qualitativen Untersuchungen ergaben die quantitativen Untersuchungen der Caeca der Sektionen 2 zu jedem Versuchszeitpunkt einen höheren Salmonellengehalt in Gruppe D als in Gruppe A. In der 54. und 69. LW war der Salmonellengehalt in Gruppe D signifikant höher (s. Abb. 12 B.).

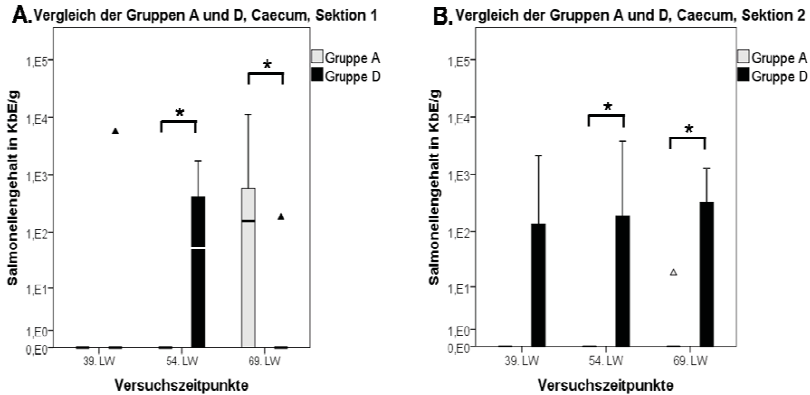


Abb. 12 **Boxplots zur log-Darstellung des Salmonellengehaltes der Caeca.** Salmonellengehalt in KbE/g in den Caeca der Gruppen A (grau) und D (schwarz) zu den Versuchszeitpunkten 39., 54., 69. LW. **A. Sektion 1 (2 Tage *p.inf.*).** **B. Sektion 2 (7 Tage *p.inf.*).**\*, signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney-Test).

#### 4.4.1.3 Leber

##### 4.4.1.3.1 Qualitative Auswertung

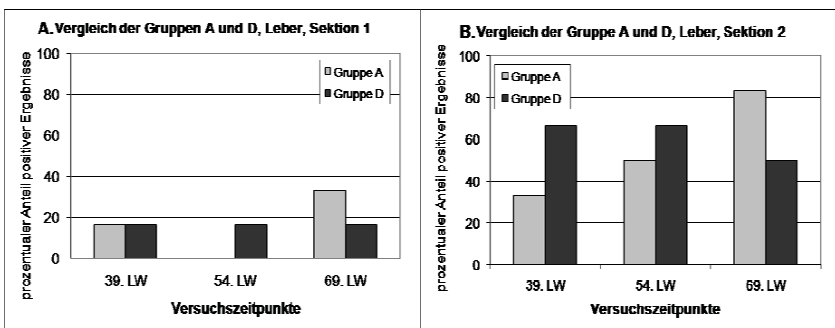


Abb. 13 **Balkendiagramm zur Darstellung qualitativ SE-positiver Leberproben.** Salmonellen-positive Befunde (in %) in den Leberproben der Versuchsgruppen A (grau) und D (schwarz) zu den Versuchszeitpunkten 39., 54. und 69. LW. **A. Sektion 1 (2 Tage *p.inf.*).** **B. Sektion 2 (7 Tage *p.inf.*).**

Die statistische Auswertung der Ergebnisse der Leberproben ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen A und D. Keine der beiden Gruppen wies durchgehend häufiger Salmonellen in der Leber auf als die andere Gruppe.

In der Sektion 1 der 39. LW war die Zahl positiver Tiere in beiden Gruppen identisch. In der Sektion 1 der 54. LW war der SE-Nachweis in Gruppe D um 16,67% höher als in Gruppe A, in der Sektion 1 der 69. LW war das Verhältnis umgekehrt.

In der Sektion 2 der 39. LW waren in Gruppe D 33,33% mehr Caecumproben SE-positiv als in Gruppe A, in der 69. LW war das Verhältnis umgekehrt. In der Sektion 1 und 2 der 54. LW waren in Gruppe D in jeweils 16,67% mehr Proben Salmonellen nachzuweisen als in den Caecumproben der Gruppe A (s. Abb. 13).

#### 4.4.1.3.2 Quantitative Auswertung

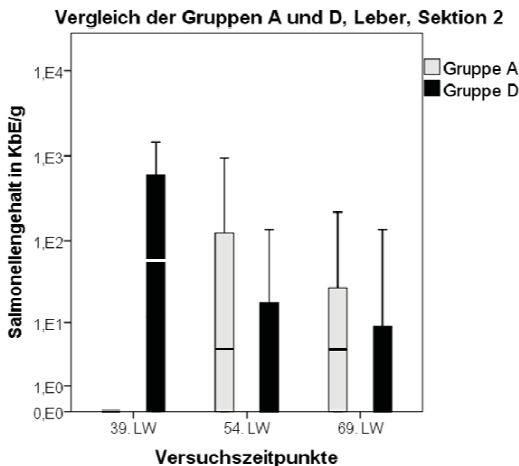


Abb. 14 **Boxplots zur log-Darstellung des Salmonellengehaltes der Leberproben.** Salmonellengehalt in KbE/g in den Leberproben der Gruppen A (grau) und D (schwarz) zu den Sektionen 2 (7 Tage *p.inf.*) der Versuchszeitpunkte 39., 54., 69. LW.

Die quantitative Untersuchung der Leberproben ergab zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen Gruppe A und D. Keine der beiden Gruppen wies durchgehend mehr Salmonellen auf als die andere.

In den Sektionen 1 konnten in beiden Gruppen nur bei jeweils einem Tier SE in der Leber quantitativ nachgewiesen werden (s. Anhang: Tab.19 und 35).

In der Sektion 2 der 39. LW konnten in Gruppe D (Median=  $8,2 \times 10^1$  KbE/g) mehr Salmonellen nachgewiesen werden als in Gruppe A (Median= 0 KbE/g). In den Sektionen 2

der 54. und 69. LW konnten in Gruppe A (Mediane=  $1,36 \times 10^1$  KbE/g) jedoch mehr Salmonellen nachgewiesen werden als in Gruppe D (Median= 0 KbE/g) (s. Abb. 14).

#### 4.4.1.4 Reproduktionsorgane

##### 4.4.1.4.1 Qualitative Auswertung

In Gruppe A konnten bei insgesamt zwei Tieren und in Gruppe D bei drei Tieren Salmonellen im Ovar nachgewiesen werden. Der Unterschied des SE-Nachweises in den Reproduktionsorganen war damit nur gering. In den Ovidukten waren in beiden Gruppen keine Salmonellen nachzuweisen (s. Anhang: Tab. 15-20 und 33-38).

##### 4.4.1.4.2 Quantitative Auswertung

In Gruppe A und D konnten bei jeweils nur einem Tier Salmonellen quantitativ im Ovar nachgewiesen werden. Die ermittelten Keimgehalte unterschieden sich nicht wesentlich (s. Anhang: Tab. 15-20 und 33-38).

#### 4.4.2 Vergleich der Gruppen C und E

##### 4.4.2.1 Ausscheidung des Infektionsstammes

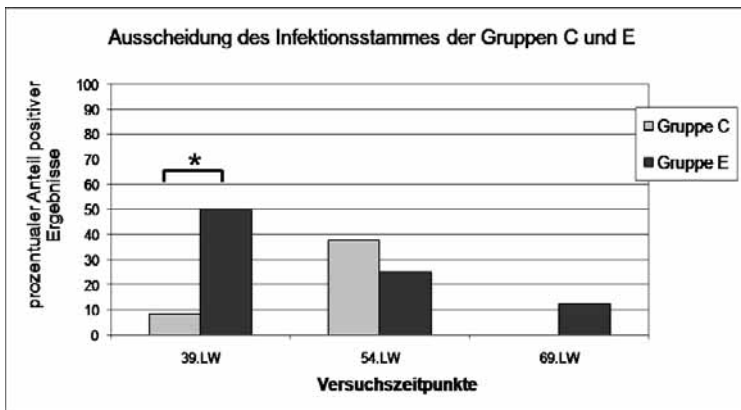


Abb. 15 Balkendiagramm zur Darstellung qualitativ SE-positiver Kloakentupfer. Salmonellen-positive Befunde (in %) in den Kloakentupfern der Versuchsgruppen C (grau) und E (schwarz) zu den Versuchszeitpunkten 39., 54. und 69. LW. \*, signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ( $p < 0,05$ , Chi-Quadrat-Test).

In der 39. LW schieden die Tiere der Gruppe E signifikant häufiger Salmonellen aus als die Tiere der Gruppe C. In der 54. LW war die Ausscheidungsrate in Gruppe C 12,5% höher als



in Gruppe E. In der 69. LW war das Verhältnis umgekehrt, in Gruppe E schieden 12,5% mehr Tiere SE aus als in Gruppe C (kein SE-Nachweis) (s. Abb. 15).

#### 4.4.2.2 Caecumwand und Caecuminhalt

##### 4.4.2.2.1 Qualitative Auswertung

In der Sektion 1 der 39. LW waren in den Caecumwand- und Caecuminhaltproben bei 33,33% mehr Tieren der Gruppe C Salmonellen nachzuweisen als der Gruppe E. In der 54. bzw. 69. LW waren jedoch in Gruppe E bei 41,67% bzw. 8,33% mehr Tieren Salmonellen qualitativ nachzuweisen als in Gruppe C (s. Abb. 16 A.).

In den Sektionen 2 konnten zu jedem Versuchszeitpunkt in Gruppe E mehr Salmonellen nachgewiesen werden als in Gruppe C. In der 39. LW war der Unterschied signifikant (s. Abb. 16).

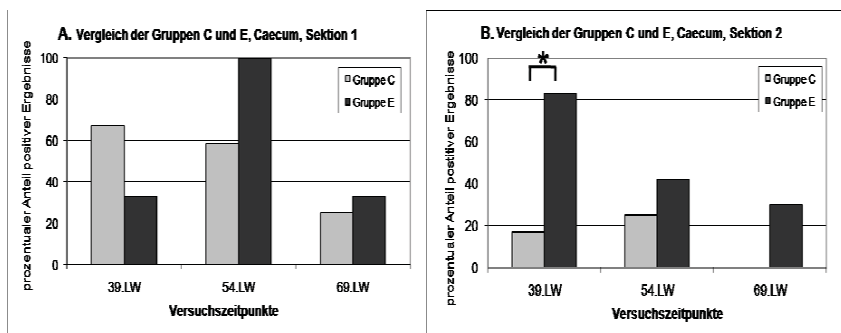


Abb. 16 Balkendiagramm zur Darstellung qualitativ SE-positiver Caeca. Salmonellen-positive Befunde (in %) in Caecumwand und Caecuminhalt der Versuchsgruppen C (grau) und E (schwarz) zu den Versuchszeitpunkten 39., 54. und 69. LW. **A. Sektion 1 (2 Tage *p.inf.*).** **B. Sektion 2 (7 Tage *p.inf.*).**\*, signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ( $p < 0,05$ , Chi-Quadrat-Test).

##### 4.4.2.2.2 Quantitative Auswertung

In den Sektionen 1 der 39. und 69. LW unterschied sich der quantitative Salmonellennachweis zwischen den Gruppen C und E nur geringfügig. In der Sektion 1, 54. LW, waren in Gruppe E (Median=  $1,36 \times 10^3$  KbE/g) jedoch signifikant mehr Salmonellen nachzuweisen als in Gruppe C (Median=  $1,9 \times 10^1$  KbE/g) (s. Abb. 17 A.).

In den Sektionen 2 waren in den Caeca der Gruppe E zu jedem Versuchszeitpunkt mehr Salmonellen quantitativ nachzuweisen als in Gruppe C. In der 39. LW war der Unterschied signifikant (Gruppe E: Median=  $5 \times 10^1$  KbE/g und Gruppe C: Median= 0 KbE/g) (s. Abb. 17 B.).

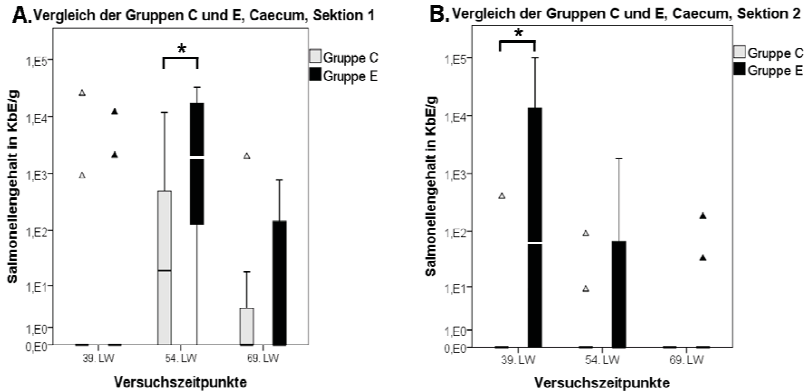


Abb. 17 **Boxplots zur log-Darstellung des Salmonellengehaltes der Caeca.** Salmonellengehalt in KbE/g in den Caeca der Gruppen C (grau) und E (schwarz) zu den Versuchszeitpunkten 39., 54., 69. LW. **A. Sektion 1 (2 Tage *p.inf.*).** **B. Sektion 2 (7 Tage *p.inf.*).**\*, signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney-Test).

#### 4.4.2.3 Leber

##### 4.4.2.3.1 Qualitative Auswertung

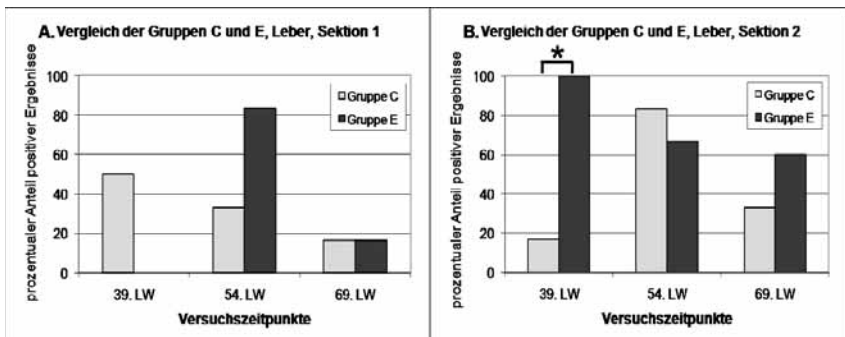


Abb. 18 **Balkendiagramm zur Darstellung qualitativ SE-positiver Leberproben.** Salmonellen-positive Befunde (in %) in den Leberproben der Versuchsgruppen C (grau) und E (schwarz) zu den Versuchszeitpunkten 39., 54. und 69. LW. **A. Sektion 1 (2 Tage *p.inf.*).** **B. Sektion 2 (7 Tage *p.inf.*).**\*, signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ( $p < 0,05$ , Chi-Quadrat-Test).

In der Sektion 1 der 39. LW waren in Gruppe C 50% mehr Leberproben SE-positiv als in Gruppe E. In der Sektion 1 der 54. LW hingegen waren in Gruppe E in 50% mehr Leberproben Salmonellen nachzuweisen als in Gruppe C. In der Sektion 1 der 69. LW war der SE-Nachweis in beiden Gruppen identisch (s. Abb. 18 A.).

In der Sektion 2 der 39. LW waren in Gruppe E signifikant mehr Leberproben und in der 69. LW 26,67% mehr Leberproben SE-positiv als in Gruppe C. In der 54. LW hingegen waren in Gruppe C in 16,67% mehr Leberproben Salmonellen nachzuweisen als in Gruppe E (s. Abb. 18 B.).

#### 4.4.2.3.2 Quantitative Auswertung

Die statistische Auswertung der quantitativen Ergebnisse der Leberproben der Gruppen C und E ergaben keine signifikanten Unterschiede.

In den Sektionen 1 konnten in beiden Gruppen nur in der 54. LW Salmonellen quantitativ nachgewiesen werden, die Salmonellengehalte unterschieden sich nur geringfügig (s. Anhang: Tab. 29 und 41).

In den Sektionen 2 der 39. und 69. LW waren in Gruppe E (Mediane= 0 KbE/g und  $1,36 \times 10^2$  KbE/g) mehr Salmonellen nachzuweisen als in Gruppe C (Mediane= 0 KbE/g). In der Sektion 2 der 54. LW war der Salmonellennachweis in Gruppe C jedoch höher (Gruppe C: Median=  $1,5 \times 10^2$  KbE/g und Gruppe E: Median=  $6,73 \times 10^1$  KbE/g) (s. Abb. 19).

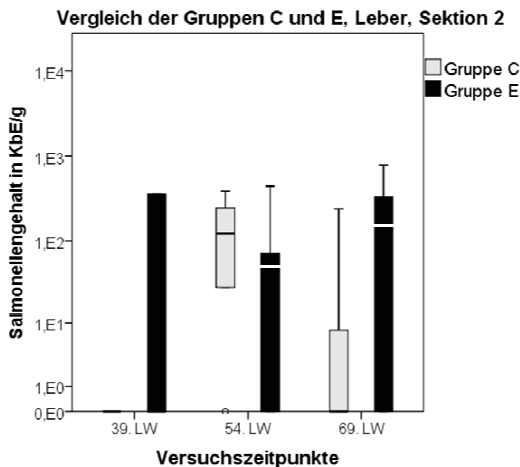


Abb. 19 **Boxplots zur log-Darstellung des Salmonellengehaltes der Leberproben.** Salmonellengehalt in KbE/g in den Leberproben der Gruppen C (grau) und E (schwarz) zu den Sektionen 2 (7 Tage *p.inf.*) der Versuchszeitpunkte 39., 54., 69. LW.

#### **4.4.2.4 Reproduktionsorgane**

##### **4.4.2.4.1 Qualitative Auswertung**

In Gruppe C konnten bei insgesamt zwei Tieren und in Gruppe E bei drei Tieren Salmonellen im Ovar qualitativ nachgewiesen werden. Die Unterschiede waren damit nur gering. In den Ovidukten konnten in beiden Gruppen keine Salmonellen nachgewiesen werden (s. Anhang: Tab. 27-32 und 39-44).

##### **4.4.2.4.2 Quantitative Auswertung**

In beiden Gruppen konnten bei jeweils zwei Tieren Salmonellen quantitativ in den Ovarien nachgewiesen werden. Die ermittelten Keimgehalte unterschieden sich nicht wesentlich (s. Anhang: Tab. 27-32 und 39-44).

## 5 DISKUSSION

Die Infektion mit zoonotische Salmonellen, insbesondere *S. Enteritidis* (SE), stellt nach wie vor ein bedeutendes Risiko für den Menschen dar (HAFEZ 2010). Da der Erreger primär über Hühnereier und Hühnereiprodukte übertragen wird, sind Bekämpfungsmaßnahmen in den Legehennenbetrieben von besonderer Bedeutung (EFSA 2010). Die Durchführung von Impfungen gegen SE stellt eine dieser Maßnahmen dar und ist gemäß Hühner-Salmonellen-Verordnung (VO) für Legehennen-Aufzuchtbetriebe verpflichtend. Wie die Impfungen durchzuführen sind, ist allerdings nicht vorgeschrieben. Daher haben sich im Laufe der Jahre verschiedene Impfschemata etabliert (ZDG 2007). Die Effizienz der einzelnen Impfstoffe ist, wenn sie entsprechend dem vom Hersteller empfohlenen Schema angewendet werden, geprüft und erwiesen. Die kombinierte Anwendung von modifizierten Lebendvakzinen (MLV) und Inaktivatvakzinen (KV) ist vom Hersteller nicht vorgesehen und nicht geprüft. Ein Impfschutz kann daher nicht garantiert werden. Nach wie vor wird über die Vorteile von MLV bzw. KV diskutiert. Generell gilt der Konsens, dass eine MLV-Impfung der KV-Impfung überlegen ist, da humorale und zelluläre Immunkomponenten induziert werden. Die KV-Impfung aktiviert primär die humoral vermittelte Immunantwort, die jedoch den fakultativ intrazellulären Erreger nur bedingt erreichen kann (s. 2.5.2.2.). Im Gegensatz zu KV dürfen MLV nicht während der Legeperiode und bis maximal drei Wochen vor Beginn der Legeperiode verabreicht werden, da ansonsten die Gefahr der Verbreitung des lebenden Organismus und die Übertragung auf den Menschen besteht. Ob der Impfschutz dennoch bis an das Ende der Legeperiode gegeben ist, oder ob er mit dem Alter der Legehennen abfällt, war eine Fragestellung dieser Studie. Von besonderem Interesse ist die Klärung dieser Frage auch, weil sich die Legeperiode in den letzten Jahren verlängert hat (bis zur 70. Lebenswoche (LW) und länger), der Impfschutz aber von einigen Impfstoffherstellern nur bis zur 50. LW garantiert wird. Um einem Nachlassen des Impfschutzes vorzubeugen, wurden die Tiere teilweise zum Zeitpunkt der Umstellung von den Aufzuchtbetrieben in die Legehennenhaltungsbetriebe mit einem KV geimpft. Ob diese zusätzliche, teure und aufwendige Impfung wirkungsvoller als die Impfung mit ausschließlich MLV ist, war eine weitere Fragestellung, die in dieser Studie geklärt werden sollte. Es wurden die in Sachsen zurzeit angewendeten Impfschemata mit und ohne zusätzliche KV-Impfung miteinander verglichen und auf Unterschiede in der Wirksamkeit geprüft.

### 5.1 Verlauf der Salmonelleninfektionen innerhalb der Gruppen

#### 5.1.1 Klinische Beobachtungen

Nur in seltenen Fällen zeigten die Tiere Symptome einer Salmonellose, was mit den Beobachtungen anderer übereinstimmt (BICHLER et al. 1996; BEAL et al. 2004a; CARVAJAL et al. 2008; SMITH und BEAL 2008). Die Salmonelleninfektion als Ursache für den Durchfall ist

naheliegend, zudem könnte der Stress während des Infektionsvorgangs dazu beigetragen haben. Für die zwei Todesfälle in der 69. LW *ante* (Gruppe B) bzw. *post infectionem* (*p.inf.*) (Gruppe E) konnten keine Ursachen ermittelt werden.

Das kannibalistische Verhalten, das in manchen Gruppen (Gruppe C: 54. LW, Gruppe A: 69. LW) beobachtet wurde, führte dazu, dass sich die attackierten Opfertiere vermehrt in die Legenester zurückzogen und weniger Wasser und Futter aufnahmen. Es ist davon auszugehen, dass diese Tiere vermehrtem physischem und psychischem Stress ausgesetzt waren. Wie dargestellt (s. 2.6.5), beeinflusst Stress die Wirts-Pathogen-Beziehung. Durch sozialen Stress bzw. Hungerstress können sich die epithelialen Strukturen sowie die normale Mikroflora im Gastro-Intestinal-Trakt (GIT) verändern. Die Anheftung der Salmonellen wird erleichtert und die intestinale Barrierefunktion wird herabgesetzt, so dass sich die Pathogene auch systemisch ausbreiten können (MULDER 1995; BURKHOLDER et al. 2008), was durch das aufgrund von Stresshormonen geschwächte Immunsystem begünstigt wird (HUMPHREY 2006).

Auch Tiere der Gruppe E (69.LW) fielen durch blutige Wunden an den Kloaken auf. Vermutlich sind diese Wunden durch das Picken der anderen Tiere entstanden, ein kannibalistisches Verhalten konnte allerdings nicht beobachtet werden.

### **5.1.2 Untersuchung der Kloakentupfer**

Der Nachweis von SE in den Kloakentupfern war insgesamt sehr variabel. Die Einzeltierbetrachtung macht deutlich, dass die Hühner SE in der Regel intermittierend ausschieden, was auch VAN IMMERSEEL et al. (2004) in ihrer Studie feststellten. Bei manchen Tieren konnten keine Salmonellen in den Kloakentupfern nachgewiesen werden, erwiesen sich bei der Untersuchung der Caeca aber dennoch als positiv. Diese Ergebnisse stellen die Zuverlässigkeit der Untersuchung von Kloakentupfern zur Bestimmung des individuellen Salmonellenstatus in Frage. VAN HOOREBEKE et al. (2008), die verschiedene Beprobungsmethoden zur fäkalen Ausscheidung verglichen, kamen gleichermaßen zu dem Ergebnis, dass sich Kloakentupferproben bei niedrigem Infektionsdruck (z.B. bei angewandtem Impfregeime) nicht für den Salmonellennachweis eignen, da die Zahl tatsächlich positiver Tiere unterschätzt wird (VAN HOOREBEKE et al. 2010).

Wird jedoch die Zahl positiver Kloakentupfer je Versuchszeitpunkt innerhalb einer Gruppe zusammengefasst und miteinander verglichen, so waren in den Gruppen B bis D in der 54. LW und in Gruppe A in der 69. LW die meisten Kloakentupfer SE-positiv, was mit den Ergebnissen des SE-Nachweises in den Blinddarmproben korreliert (s. 5.1.3.2). In Gruppe E waren in der 39. LW geringfügig mehr Salmonellen in den Kloakentupfern nachzuweisen als in der 54. LW. Dies korreliert mit den Ergebnissen der Blinddarmuntersuchungen der Sektionen 2, die ebenfalls einen maximalen SE-Nachweis in der 39. LW ergaben.

In der Regel konnten im Verlauf der Beprobungszeitpunkte (ein, drei und fünf Tage *p.inf.*) eines Versuchszeitpunktes (39., 54., 69. LW) am dritten Tag nach der Infektion die meisten Salmonellen nachgewiesen werden. Am fünften Tag nach der Infektion waren nur wenige Kloakentupfer positiv, was mit den Ergebnissen von HAHN (1999) und BARROW (1991) korreliert, die zwei bzw. vier Tage *p.inf.* die meisten Salmonellen-positiven Kloakentupfer nachwiesen und dann eine Abnahme verzeichneten. Die Ausscheidung nahm demnach ab bzw. wurden die Salmonellen bereits im GIT durch zelluläre und humorale Komponenten des Immunsystems eliminiert (s. 2.5.1.1 und 2.5.2.1).

### **5.1.3 Untersuchung der Blinddärme**

#### **5.1.3.1 Pathologisch-anatomische Untersuchung**

Die Befunde der pathologisch-anatomischen Untersuchung, vorwiegend Verwachsungen des Darmkonvolutes, waren von chronischer Natur, das heißt (d.h.) sie waren schon vor der Versuchsdurchführung vorhanden und sind nicht auf die experimentelle Salmonelleninfektion zurückzuführen. Auch in anderen Studien waren die pathologisch-anatomischen Untersuchungen des GIT nach der Infektion mit Salmonellen in der Sektion unauffällig (HUMPHREY et al. 1991; SUZUKI 1994; CARVAJAL et al. 2008).

#### **5.1.3.2 Reisolierung des Infektionsstammes**

In der Caecumwand und im Caecuminhalt konnten im Vergleich zu den anderen Organen generell am häufigsten Salmonellen nachgewiesen werden und die höchsten Keimgehalte (Mittelwerte:  $8,02 \times 10^2$  KbE/g in der Caecumwand und  $1,25 \times 10^3$  KbE/g im Caecuminhalt) bestimmt werden. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen anderer Wissenschaftler, die das Caecum als Hauptlokalisationsort der Salmonellen bezeichnen (BARROW et al. 1987; METHNER et al. 1995b; SPRINGER et al. 2011). SPRINGER et al. (2011), die gleichermaßen geimpfte Hennen (24., 51., 71. LW) mit SE infizierten, konnten höhere durchschnittliche Keimzahlen (Mittelwerte  $> 5,25 \times 10^4$  KbE/g) verzeichnen, allerdings fassten sie die Ergebnisse von qualitativer und quantitativer Untersuchung zusammen, d.h. qualitativ positive Proben wurden als  $\log_{10} = 1$  gewertet (SPRINGER et al. 2011). Eine Vergleichbarkeit ist daher nur bedingt gegeben. Die Verwendung einer entsprechenden Methodik hätte auch in der vorliegenden Studie zu höheren Keimzahlen geführt, allerdings wären die Ergebnisse nicht so genau und detailliert gewesen.

Bis auf Gruppe A konnten in der 54. LW tendenziell am meisten Salmonellen in den Caeca nachgewiesen werden. In Absatz 5.1.5.2 wird dieses Ergebnis in Verbindung mit den Ergebnissen der Leberproben diskutiert und Rückschlüsse auf den Verlauf der Immunität gezogen.

Die Caecumbesiedelung war in der Regel in den Sektionen 1 stärker, teilweise signifikant stärker ausgeprägt als in den Sektionen 2. Die Untersuchung der Kloakentupfer, die eine Abnahme der Ausscheidung zum Zeitpunkt fünf Tage *p.inf.* ergab, bestätigt den Befund, dass sich sieben Tage nach der Infektion weniger Salmonellen im Caecuminhalt befanden als zwei Tage nach der

Infektion. Im Unterschied dazu fanden CARVAJAL et al. (2008) vier bis sieben Tage *p.inf* die größten Salmonellen-besiedelten Areale in der Caecumwand und sieben Tage *p.inf*. quantitativ am meisten Salmonellen im Caecuminhalt. Sie verwendeten in ihrer Studie den gleichen Infektionsstamm (*S. Enteritidis* 147Nal'), allerdings lag die Infektionsdosis bei  $2,00 \times 10^8$  KbE. Außerdem waren die geimpften Tiere (zweimalig MLV) erst acht Wochen alt und im Gegensatz zu den Tieren dieser Studie noch nicht mit der dritten Booster-Impfung immunisiert. Vermutlich verfügten die Tiere daher über eine schwächere Immunität gegen SE und konnten den Infektionsstamm nicht so schnell aus Caecumwand und -inhalt eliminieren wie die Mehrheit der Tiere der vorliegenden Studie. Es ist anzunehmen, dass auch die Tiere der Gruppen E (39. LW) und D (39. und 69. LW) den Infektionsstamm nicht so schnell abwehren konnten, wie die anderen Versuchstiere. Mit der Untersuchung des Verlaufs der Eliminierung des Erregers nach einer Infektion kann die Effizienz einer vorhergehenden Immunisierung geprüft werden (METHNER et al. 1995b). Die schnelle Eliminierung des Erregers aus dem GIT ist insbesondere für die Einschränkung der Verbreitung des Erregers durch den Kot und die Kontamination von Eiern von Bedeutung (s. 2.4.4).

Im Gegensatz zu den Sektionen 1 war in den Sektionen 2 in der Caecumwand mehrfach ein höherer Salmonellengehalt zu verzeichnen als im Caecuminhalt. Dies ist vermutlich mit der Einwanderung der Salmonellen in die Caecumwand und der Persistenz in dieser bzw. der luminalen Eliminierung und der Ausscheidung der Salmonellen zu erklären. Allerdings ist mit der angewendeten Methodik eine Differenzierung der Ergebnisse von Caecumwand und Caecuminhalt nur bedingt möglich, da die Caecumwand nicht wie in anderen Studien zunächst vom Caecuminhalt gereinigt wurde (SPRINGER et al. 2011), bzw. eine Immunhistochemie von ausschließlich der Caecumwand zur Detektion des Infektionsstammes durchgeführt wurde (BERNDT et al. 2007; CARVAJAL et al. 2008).

Wie beschrieben (s. 5.1.2) kann mit der Untersuchung der Kloakentupfer einer Hühnergruppe keine Aussage über die absolute Zahl SE-positiver Tiere bzw. den SE-Status eines einzelnen Tieres gemacht werden. Die Bestimmung des Keimgehaltes im Caecuminhalt in der Sektion korrelierte nicht inhärent mit dem Ergebnis der Kloakentupferuntersuchung ein Tag zuvor. Zu diesem Ergebnis kamen auch VAN IMMERSEEL et al. (2004). Dennoch scheint der SE-Nachweis in den Kloakentupfern einer Gruppe über den Zeitraum eines Versuchszeitpunktes mit dem SE-Nachweis in den Caeca desselben Versuchszeitraumes zu korrelieren. Eine Untersuchung der Kloakentupfer scheint also lediglich für die Abschätzung des tendenziellen SE-Status einer Gruppe bzw. des SE-Herdenstatus sinnvoll zu sein, insbesondere im Vergleich zu anderen Beprobungszeitpunkten bzw. Beprobungsgruppen.



#### **5.1.4 Untersuchung der Leber**

##### **5.1.4.1 Pathologisch-anatomische Untersuchung**

Veränderungen der Leber lagen nur bei einem Tier (Gruppe E, 69. LW, Sektion 2) vor. Es wies eine Hepatomegalie auf, die wahrscheinlich nicht auf die Salmonelleninfektion zurückzuführen ist, da keine Salmonellen in dieser Leber nachzuweisen waren. Auch in anderen Studien konnten nach der Infektion geimpfter Tiere keine pathologischen Veränderungen der Leber festgestellt werden (NANDRE et al. 2011).

##### **5.1.4.2 Reisolierung des Infektionsstammes**

Die Leber stellte sich von den untersuchten Organen, wie bereits in anderen Studien als das nach dem Caecum am häufigsten SE-positiv getestete Organ heraus (METHNER et al. 1995b; DUCHET-SUCHAUX et al. 1997). Die qualitative Untersuchung ergab Nachweishäufigkeiten von bis zu 100%, mit der quantitativen Untersuchung konnte ein durchschnittlicher Salmonellengehalt von  $4,16 \times 10^1$  KbE/g (max.  $1,45 \times 10^3$  KbE/g) gefunden werden. Mit einem gemittelten Salmonellengehalt von  $2,51 \times 10^0$  KbE/g konnten CARVAJAL et al. (2008) etwas niedrigere Salmonellenzahlen als in der vorliegenden Studie in den Lebern geimpfter Hennen finden. SPRINGER et al. (2011), die wie beschrieben eine alternative Auswertungsmethodik verwendeten, fanden in den Leberproben Keimgehalte von durchschnittlich  $1,95 \times 10^1$  bis  $5,25 \times 10^2$  KbE/g. Im Gegensatz dazu fanden ATTERBURY et al. (2009), die geimpften (MLV oder KV) Hennen im Alter von 17 Wochen mit SE infizierten, auch nach der Anreicherung der Leberproben keine Salmonellen. Es wurden jedoch keine Leberhomogenate untersucht, sondern Tupferproben aus der Leber (ATTERBURY et al. 2009). Im Allgemeinen ist es, wie dargestellt (s. 2.6.2.1), schwierig, den Infektionsverlauf verschiedener Challenge-Versuche zu vergleichen, da sich die SE-Infektionsstämme in ihrer Virulenz, Invasivität und anderen Charakteristika zum Teil stark unterscheiden (OKAMURA et al. 2001).

Wie die Caecum-Untersuchungen ergaben auch die Untersuchungen der Leberproben in den Gruppen B, C und Gruppe E (Sektion 1) einen maximalen SE-Nachweis in der 54. LW. In Gruppe D nahm der SE-Nachweis in den Leberproben mit dem Alter der Tiere stetig ab. Die Abnahme der Salmonellennachweise in den Blinddarm- und Leberproben von der 54. LW zur 69. LW spricht dafür, dass die Immunität der Tiere am Ende der Legeperiode nicht nachließ. Grundsätzlich wird angenommen, dass der Immunschutz mit dem Alter der Tiere abnimmt, bzw. das Immunsystem am Ende der Legeperiode geschwächt ist (EFSA 2010). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen jedoch vermuten, dass die Tiere in der 54. LW, d.h. in etwa der Mitte der Legeperiode, empfindlicher auf Salmonellen reagieren. HUMPHREY et al. (1991) infizierten ungeimpfte 20 und 52 LW alte Hühner mit SE vom Phagentyp 4 (s. 2.1.3) und verglichen deren Reaktionen auf die Infektion. Die älteren Tiere zeigten im Gegensatz zu den jüngeren Tieren klinische Symptome

einer Salmonellose, wiesen mehr Salmonellen in den Organen auf und eine im Vergleich zu den jüngeren Tieren reduzierte humorale Immunantwort. Ihre Erklärung für die empfindlichere Reaktion der älteren Tiere ist eine mit der intensiven Legeleistung der älteren Tiere assoziierte Schwächung des Immunsystems und eine Calcium-Depletion, vor der die jüngeren Tiere durch Oestrogene geschützt sind. SPRINGER et al. (2011) untersuchten die Infektion von 24, 51 und 71 LW alten Tieren mit dem gleichen SE-Stamm wie in der vorliegenden Studie und wiesen bei den ungeimpften Tieren der Kontrollgruppe im Alter von 51 LW in Blinddarm- und Leberproben entsprechend mehr Salmonellen nach als bei den 24 und 71 LW alten Tieren. Dies führt zu der Annahme, dass Legehennen unabhängig von einer Impfung gegen Ende der Legeperiode resistenter auf Salmonellen reagieren als in der mittleren Phase der Legeperiode. In der vorliegenden Studie fehlen die Ergebnisse einer ungeimpften Kontrollgruppe. Eine Aussage über die Immunität ungeimpfter Tiere im Vergleich zu geimpften Tieren kann daher nicht getroffen werden. Da die Kontrolltiere der Studie von SPRINGER et al. (2011) im Vergleich zu den geimpften Tieren derselben Studie und im Vergleich zu den geimpften Tieren dieser Studie zu jedem Versuchszeitpunkt durchschnittlich mehr SE in Leber- und Caecumproben aufwiesen, ist von einer durch die Impfung induzierten Stärkung der Salmonellenabwehr bis an das Ende der Legeperiode auszugehen. Vermutlich tragen sowohl die Impfung als auch von der Impfung unabhängige Faktoren zu einer gesteigerten Salmonellenabwehr gegen Ende der Legeperiode bei. Einer dieser Faktoren scheint die nachlassende Legeleistung und der damit einhergehende nachlassende Legestress der Tiere am Ende der Legeperiode darzustellen (s. 2.6.5). Auch eine natürlich bedingte Altersresistenz der Tiere ist anzunehmen.

Unter natürlichen Bedingungen können z.B. konkurrierende Krankheiten oder Temperatureinflüsse den Verlauf einer Salmonelleninfektion beeinflussen (HUMPHREY 2006; HAFEZ 2010). Der Versuchsdurchlauf in der 54. LW begann im August 2010, d.h. die Tiere waren vermutlich zuvor in den nicht-vollklimatisierten Herkunftsbetrieben aufgrund erhöhter Temperaturen (LADISCH et al. 2011) vermehrtem Hitzestress ausgesetzt (HUMPHREY 2006). Tiere der Gruppe C zeigten zudem in der 54. LW ein ausgeprägtes kannibalistisches Verhalten, was die Tiere zusätzlich geschwächt und vermutlich u.a. zu der stärkeren Belastung mit SE als zu den Versuchszeitpunkten 39. und 69. LW geführt hat.

In der quantitativen und qualitativen Untersuchung der Leberproben konnten im Gegensatz zum Caecum sieben Tage *p.inf.* häufiger Salmonellen gefunden werden als zwei Tage *p.inf.*. Lediglich in Gruppe B, 69. LW, war das Verhältnis umgekehrt. Ein Grund dafür könnte sein, dass in der 69. LW für die Sektion 1 die scheinbar schwächsten und damit Salmonellen-empfindlichsten Tiere selektiert und aus Tierschutzgründen euthanasiert wurden, um weitere Todesfälle zu verhindern. Andere Autoren konnten zu dieser Studie zeitlich korrelierende SE-Zunahmen in den Lebern verzeichnen (KRAMER et al. 2001; CARVAJAL et al. 2008). Der höhere Salmonellengehalt in der Leber sieben Tage *p.inf.* ist vermutlich auf die zunehmende systemische Verbreitung der

Salmonellen von der Darmwand in die inneren Organe, primär Leber und Milz, zurückzuführen. Innerhalb von 24-48 Stunden gelangen die Salmonellen vorwiegend intrazellulär (HENDERSON et al. 1999; CHAPPELL et al. 2009) in die Blutbahn und die genannten Organe (BARROW et al. 1987; ZHANG-BARBER et al. 1999; PHALIPON und SANSONETTI 1999; VAN IMMERSEEL et al. 2002b). Mit der Abnahme des Salmonellennachweises in den Caeca nahm die Zahl der Salmonellen in der Leber zu, was für diesen Shift der Salmonellen vom Darm in die Leber spricht. CHAPPELL et al. (2009) bezeichnen diesen Shift bzw. die Invasion der inneren Organe als die „zweite Phase der Salmonelleninfektion“ (CHAPPELL et al. 2009). Wie stark diese Phase ausgeprägt ist, bzw. wie invasiv sich die Salmonellen verhalten, ist u.a. wie dargestellt Phagentyp-abhängig (s. 2.1.3). Leber und Milz scheinen die (Salmonellen-phagozytierenden-) Immunzellen aus dem Blut zu filtrieren (HE et al. 2010) und fungieren dann als primäre Vermehrungsstätten für Salmonellen (BARROW 1991). Beim Menschen konnte eine Vermehrung der Salmonellen in diesen Organen sowohl in phagozytierenden als auch nicht-phagozytierenden Zellen wie den Hepatozyten aufgezeigt werden (LAI et al. 1992; NNALUE et al. 1992). HE et al. (2010) untersuchten mithilfe der quantitativen Realtime-Polymerase-Chain-Reaction-Methode (Realtime-PCR) die Verbreitung von SE im Hühnerorganismus und konnten auch in Herz, Niere, Pankreas und Gallenblase Salmonellen finden. Die ermittelten SE-Konzentrationen waren allerdings deutlich geringer als in Leber und Milz.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von KRAMER et al. (2001) korrelierten in dieser und in anderen Studien in der Regel der Salmonellengehalt der Caeca positiv mit dem Salmonellengehalt der Leberproben (SPRINGER et al. 2011). D.h. in den Gruppen, in welchen ein hoher Salmonellengehalt in den Caeca gefunden wurde, konnten auch in den Leberproben in den meisten Fällen im Verhältnis hohe Keimgehalte bestimmt werden. KRAMER et al. (2001) verzeichneten negativ korrelierende Ergebnisse für den Salmonellengehalt in Caeca und Leberproben. Tiere, die einen hohen Salmonellengehalt in den Caeca aufwiesen, waren in den inneren Organen nur geringfügig besiedelt. Bei diesen Tieren waren eine reduzierte Phagozytenaktivität und eine gesteigerte humorale Immunabwehr festzustellen. Allerdings handelt es sich bei den von ihnen infizierten und untersuchten Tieren um ungeimpfte Masthähnchen, was u.a. die abweichenden Ergebnisse bedingen könnte (KRAMER et al. 2001). Im Allgemeinen hindert eine gesteigerte humorale lokale Abwehr im GIT die Salmonellen bereits an der Passage der Darmwand und einer systemischen Verbreitung und ist damit effektiver als die humorale systemische Abwehr (DESMIDT et al. 1998). Haben die luminalen Salmonellen die Darmbarriere bzw. Caecumwand passiert, so ist der wichtigste Schutzmechanismus überwunden.

Bemerkenswert war, dass in Gruppe E die Zahl qualitativ positiver Leberproben der Sektionen 2 mit dem Alter der Legehennen abnahm. Die Zahl der Leberproben, in welchen Salmonellen quantitativ nachgewiesen werden konnten, sowie der ermittelte Salmonellengehalt nahmen jedoch zu (s. 4.3.5.5.). Eine Erklärung für diesen Verlauf der Ergebnisse könnte der unterschiedliche

Verlauf der Immunität der Tiere sein. In der 39. LW, d.h. etwa 21 Wochen nach der letzten Impfung war die Immunität und Gesundheit der Tiere noch relativ einheitlich. Zwar konnte sieben Tage *p.inf.* bei jedem Tier SE in der Leber qualitativ nachgewiesen werden - möglicherweise war die Verbreitung der Salmonellen aufgrund der verzögerten Eliminierung der Salmonellen aus den Blinddärmen erleichtert - quantitativ waren jedoch nur wenige Salmonellen vorhanden. Am Ende der Legeperiode war die Gruppe scheinbar nicht mehr einheitlich. Die robusteren Tiere waren in der Lage, die Salmonellen relativ schnell zu eliminieren bevor es zu einer systemischen Verbreitung und Besiedelung der Leber kommen konnte. Die schwächeren Tiere hingegen konnten die Salmonellen kaum abwehren und sich nicht vor einer systemischen Infektion mit einer verhältnismäßig starken Besiedelung der Leber schützen.

Ebenfalls auffällig war, dass die Tiere der Gruppe A im Vergleich zu den vorhergehenden Versuchszeitpunkten in der 69. LW einen schlechteren physischen Zustand (Befiederung und Bemuskelung) und ein kannibalistisch geprägtes Verhalten aufwiesen. Dies könnte zu einer Schwächung des Immunsystems dieser Tiere geführt haben (s. 2.6.5). Möglicherweise waren deshalb bei diesen Tieren in den Caecum- und Leberproben mehr Salmonellen nachzuweisen als bei den 39 und 54 LW alten Tieren (s. Abb. 5). Ein Nachlassen der durch die Impfung (ausschließlich MLV) induzierten Immunität ist nicht auszuschließen, vermutlich war jedoch auch das geschwächte Immunsystem der Tiere für die reduzierte Salmonellenabwehr ursächlich.

### **5.1.5 Untersuchung der Reproduktionsorgane**

#### **5.1.5.1 Pathologisch-anatomische Untersuchung**

Die überwiegend atrophischen Veränderungen der Reproduktionsorgane traten primär am Ende der Legeperiode auf und waren von chronischer Natur. Ein Zusammenhang mit der Salmonelleninfektion ist eher unwahrscheinlich, was durch die Ergebnisse des Salmonellennachweises bestätigt wird. Bis auf das Ovidukt von Tier 101 der Gruppe B (Sektion 2, 69. LW) waren in den veränderten Organen keine Salmonellen nachzuweisen. Aufgrund der reduzierten Durchblutung zurückgebildeter Organe war der Übergang der Salmonellen von dem gut ausgeprägten Netz von Blutgefäßen der Reproduktionsorgane, insbesondere des Ovars (GRIFFIN et al. 1984) in das Gewebe vermutlich eingeschränkt.

HASSAN und CURTISS (1997) konnten in ihren Infektionsversuchen entsprechend der vorliegenden Studie keine durch SE verursachten Veränderungen am Reproduktionstrakt aufzeigen. In Abhängigkeit des Infektionsstammes können Salmonellen allerdings insbesondere bei ungeimpften Tieren pathologische Veränderungen des Reproduktionstraktes hervorrufen (BARROW und LOVELL 1991; HUMPHREY et al. 1991; KINDE et al. 2000).

### 5.1.5.2 Reisolierung des Infektionsstammes

Aus den Reproduktionsorganen konnten insgesamt nur vereinzelt Salmonellen reisoliert werden, was mit der Untersuchung von DUCHET- SUCHAUX et al. (1997) einhergeht. Da die Besiedelung der Reproduktionsorgane einen ersten wichtigen Schritt in der Kontamination der Eier darstellt (KELLER et al. 1995; MIYAMOTO et al. 1997; OKAMURA et al. 2001), ist sie ein wichtiger Aspekt in der Evaluierung der Wirksamkeit von Salmonellenimpfstoffen.

Sieben Tage *p.inf.* waren in der Regel häufiger Salmonellen in den Reproduktionsorganen nachzuweisen als zwei Tage *p.inf.*, was mit der schon angeführten systemischen Verbreitung der Salmonellen erklärt werden kann (s. 2.4.1. und 5.1.4.2). Tiere, die SE-positive Ovarien aufwiesen waren meist auch in der Leber SE-positiv. Nachdem also die Salmonellen vom Darm in die Leber gelangt waren, konnten sie weiter in die Reproduktionsorgane, primär das Ovar, vordringen. OKAMURA et al. (2001) bzw. MIYAMOTO et al. (1996) infizierten ungeimpfte Hühner intravenös bzw. subkutan und kamen zu dem ähnlichen Ergebnis, dass sieben Tage nach der Infektion häufiger Salmonellen in Ovar und Ovidukt nachzuweisen sind als vier Tage nach der Infektion.

Bei einigen Tieren konnte SE sieben Tage *p.inf.* im Reproduktionstrakt nachgewiesen werden, obwohl der Blinddarm SE-negativ war. DE BUCK et al. (2004b) beschrieben gleichermaßen, dass die Besiedelung von Blinddarm und Reproduktionstrakt unabhängig voneinander sind.

Zum Versuchszeitpunkt des maximalen SE-Nachweises in Caecum- und Leberproben konnten in der Regel auch in den Reproduktionsorganen die meisten Salmonellen nachgewiesen werden. Lediglich in Gruppe E waren in der 69. LW die meisten Salmonellen im Ovar nachzuweisen, was auf das bereits beschriebene Phänomen des mit dem Alter der Tiere divergierenden Immunstatus (s. 5.1.4.2) erklärt werden kann. Ein paar Tiere waren am Ende der Legeperiode derartig geschwächt, dass sie die systemische Salmonelleninfektion und die damit einhergehende Besiedelung der Reproduktionsorgane nicht abwehren konnten.

Entsprechend der Ergebnisse verschiedener Studien konnten in den Ovarien mit 6,74% positiven Befunden (Gruppen A bis E zusammengefasst) häufiger Salmonellen nachgewiesen werden als im Ovidukt (0,56% positive Befunde aller Gruppen zusammengefasst) (BARROW und LOVELL 1991; METHNER et al. 1995a; GANTOIS et al. 2008b; EL-TRAS et al. 2010). Andere postulieren, dass das Ovidukt häufiger mit SE besiedelt sein muss, da das Eiweiß häufiger mit Salmonellen belastet ist als das Eigelb (KELLER et al. 1995). Wie dargestellt (s. 2.4.3), sind in der Isthmus- und Magnumdrüsenregion häufiger Salmonellen lokalisiert als in anderen Bereichen des Oviduktes. In der vorliegenden Studie wurde die Probenentnahme und Untersuchung nicht auf diese Bereiche eingeschränkt, was den geringen SE-Nachweis in diesem Organ im Vergleich zu anderen Studien bedingen könnte (HOOP und POSPISCHIL 1993; KELLER et al. 1995; DE BUCK et al. 2004a). Eine Kontamination der vereinzelt positiven Oviduktprobe während oder nach der Entnahme ist unwahrscheinlich, da auf eine sterile Arbeitsweise geachtet wurde und die Organe logistisch entnommen wurden. Demnach wurden zunächst die niedrig-kontaminierten Organe

(Reproduktionstrakt) und dann die stärker kontaminierten Organe entnommen. Mit einem Keimgehalt von  $4,64 \times 10^2$  KbE/g wurde zudem ein im Verhältnis zu den Ovarien hoher Keimgehalt bestimmt, der eine Kreuzkontamination der Reproduktionsorgane ausschließen lässt.

#### Zusammenfassung:

Die Immunität der Tiere der Gruppen B bis E schien am Ende der Legeperiode nicht nachzulassen. Es ist jedoch anzunehmen, dass außer der Impfung verschiedene von der Impfung unabhängige Faktoren (Legeleistung, Sozialverhalten, Zustand der Tiere, Umgebungstemperaturen, Altersresistenz) die Immunität der Legehennen beeinflussen. So ist die im Vergleich zur 54. LW verbesserte Salmonellenabwehr der Gruppen B bis E am Ende der Legeperiode vermutlich nicht ausschließlich auf die Impfung zurückzuführen.

Es ist anzunehmen, dass die reduzierte Salmonellenabwehr der 69 LW alten Tiere der Gruppe A auf eine Abnahme der durch die Impfung induzierten Immunität zurückzuführen ist. Möglicherweise hat auch der im Vergleich zu den jüngeren Tieren geschwächte Zustand der Tiere dazubeigetragen. Eine Kontrollgruppe u.a. zur Beurteilung dieser von der Impfung unabhängigen Faktoren fehlt.

Mithilfe der Kloakentupferuntersuchung konnte lediglich eine tendenzielle Aussage über den Infektionsgrad der Gruppen gemacht werden.

Von der Sektion 1 zur Sektion 2 konnte ein Shift der Salmonellen aus den Caeca in die inneren Organe (primär Leber und vereinzelt Reproduktionsorgane) konstatiert werden. Dieser Shift ist auf die systemische Verbreitung der Salmonellen, die primär intrazellulär stattfindet, zurückzuführen.

## 5.2 Vergleich der Impfschemata (MLV vs. MLV und KV)

Im Folgenden werden entsprechend der Zielstellung dieser Studie Unterschiede zwischen den Impfgruppen, die ausschließlich mit MLV geimpft wurden und den Impfgruppen, die mit MLV und zusätzlich mit KV geimpft wurden, aufgezeigt. Dafür wurde Gruppe A (MLV 1) mit Gruppe D (MLV 1 + KV 2) und Gruppe C (MLV 1 + MLV 3) mit Gruppe E (MLV 1 + MLV 3 + KV 2) verglichen. Die Gruppen A und C wurden im Unterschied zu den Gruppen D und E nicht zusätzlich mit einem KV geimpft (Erläuterungen zu den Impfstoffen s. 3.1.5 und Impfschemata s. Tab. 2) und können daher mit Einschränkung (s. unten) als jeweilige Kontrollgruppen herangezogen werden.

In der Regel war die Besiedelung von Caecumwand und -inhalt sowie die Erregerausscheidung der Tiere der Gruppen D und E, die zusätzlich mit einem Inaktivatimpfstoff geimpft wurden, stärker ausgeprägt als bei den Tieren der jeweiligen Kontrollgruppen A und C. Die Besiedelung von Leber und Reproduktionstrakt unterschied sich in den vier Gruppen nicht wesentlich. Demnach scheint

die Zusatzimpfung mit einem KV keinen effektiveren Schutz vor SE zu bieten als eine Impfung mit ausschließlich MLV.

Wie bereits angedeutet können die Gruppen A und C nur eingeschränkt als Kontrollgruppen bezeichnet werden. Um Kontrollgruppen im klassischen Sinne handelt es sich aus den folgenden Gründen nicht. Die Impfschemata der Gruppen E und C unterscheiden sich abgesehen von der KV-Impfung auch in der Abfolge der MLV-Impfungen. In beiden Gruppen wurden die Impfungen mit dem SE-Impfstamm MLV 1 entsprechend dem vom Hersteller empfohlenen Schema durchgeführt, d.h. der Impfschutz gegen SE sollte gegeben sein und sich nicht unterscheiden. Es ist davon auszugehen, dass die zeitlich voneinander abweichenden Impfungen mit dem STM-Impfstamm MLV 3 die Immunität gegen SE nicht wesentlich beeinflussten (s. 2.6.2.1). Da alle vier Gruppen aus verschiedenen Herden stammten, wiesen die Tiere zudem von den Impfschemata unabhängige Unterschiede auf. So waren die Tiere der Gruppe A 18 Tage jünger als die Tiere der Gruppe D und die Tiere der Gruppe C waren zehn Tage älter als die Tiere der Gruppe E. Wie dargestellt (s. 2.5.3) ist die Immunreaktion von Hühnern auf Salmonellen altersabhängig (METHNER et al. 1995b; BEAL et al. 2004a; EFSA 2010). Diese Altersabhängigkeit ist jedoch insbesondere in den ersten Lebenswochen von besonderer Bedeutung, da die Entwicklung des Immunsystems in diesem Zeitraum stattfindet (s. 2.5). Zum Zeitpunkt der Infektion waren die Versuchstiere mindestens 37 LW alt, d.h. der Altersunterschied sollte keine bedeutenden Auswirkungen auf die Ergebnisse haben.

Da die Tiere aus verschiedenen Legehennenhaltungen stammten, die sich zwar in der Herdengröße (> 12.000 Tiere) und -leistung weitestgehend entsprachen (Gruppe C und E stammen aus Betrieben eines Unternehmens), sind haltungsbedingte Unterschiede anzunehmen. Zu beobachten war in den Gruppen A (69. LW) und C (54. LW) kannibalistisches Verhalten, das wie beschrieben die Salmonellenabwehr negativ beeinflussen kann. So stellte die 69. LW den einzigen Versuchszeitpunkt dar zu dem in Gruppe A in der Sektion 1 qualitativ und quantitativ mehr Salmonellen in den Caeca und in der Sektion 2 qualitativ und quantitativ mehr Salmonellen in den Leberproben nachgewiesen werden konnten als in Gruppe D. Dennoch erwiesen sich Gruppe A und C als insgesamt (den gesamten Versuch betreffend) weniger mit SE belastet als die Gruppen D und E. Teilweise lagen Unterschiede im äußeren Erscheinungsbild der Tiere (Befiederung, Bemuskelung, makroskopische pathologische Veränderungen) vor, was mit Unterschieden im allgemeinen Gesundheits- bzw. Immunstatus einhergehen kann. Inwiefern diese Unterschiede haltungsbedingt sind, ist schwierig einzuschätzen, da auch Tiere eines Herkunftsbetriebes derartige Unterschiede aufwiesen. So machten die Tiere der Gruppe A in der 69. LW einen schwächeren Eindruck als in der 39. und 54. LW.

In der Literatur sind zahlreiche Untersuchungen zur Effizienz der applizierten MLV- bzw. KV-Impfstoffe zumindest unter experimentellen Bedingungen beschrieben (EFSA 2004). Studien zu einer kombinierten Anwendung von MLV und KV, bzw. den derzeit in den Betrieben konkret

angewendeten Impfschemata sind nur in geringem Maße vorhanden. SPRINGER et al. (2011) verwendeten für ihre Challenge-Studie eine Impfgruppe, die dreimal mit einem MLV gegen SE (entsprechend der Gruppen A) und eine zweite Impfgruppe, die zweimal mit einem MLV gegen SE und einmal mit einem KV gegen SE und STM geimpft wurde. Zwar unterschieden sich die Ergebnisse für den SE-Nachweis in den geimpften Gruppen signifikant von denen der ungeimpften Kontrollgruppe, zwischen den Impfgruppen konnten jedoch nur geringfügige Unterschiede verzeichnet werden. Die Impfgruppe mit dem höheren SE-Gehalt variierte in Abhängigkeit des Versuchszeitpunktes (24., 51., 71. LW). HAFEZ et al. (2001) führten eine Feldstudie zum Impfschutz von Legehennen in zwölf verschiedenen Betrieben mit 35.000 bis 75.000 Tieren, die entsprechend der zweiten Impfgruppe der Studie von SPRINGER et al. gegen SE und STM geimpft worden waren, durch. Das Resultat war variabel und nicht zufriedenstellend. In sechs der zwölf Betriebe konnte SE nachgewiesen werden. Bei Tieren, die am ersten Lebenstag infiziert worden waren, konnte die Impfung den Erreger nicht eliminieren.

Das für die Tiere der vorliegenden Studie sowie den Studien von SPRINGER et al. (2011) und HAFEZ et al. (2001) verwendete kombinierte Impfreime aus MLV (drei- bzw. zweimalig) und KV (einmalig) entspricht zwar den Empfehlungen des ZDG (ZDG 2007), nicht aber dem vom Hersteller empfohlenen und auf Wirksamkeit geprüften Impfschema (CLIFTON-HADLEY et al. 2002; WOODWARD et al. 2002). Demnach sollen die KV zwei- bis dreimal im Alter von einer, vier und eventuell 18 LW intramuskulär appliziert werden (HAFEZ 2001). Eine Kombination der KV mit MLV sieht der Hersteller nicht vor. Die Wirksamkeit eines von der Herstellerempfehlung abweichenden Impfschemas ist nicht erwiesen.

Für Gruppe B (MLV 2 + KV 1), die im Gegensatz zu den anderen vier Gruppen mit MLV 2 geimpft wurde, fehlt eine Kontrollgruppe ohne zusätzliche KV-Impfung. Da in den sächsischen Legehennenbetrieben derzeit kein Impfschema angewendet wird, das ausschließlich MLV 2 ohne zusätzliche KV beinhaltet, war die Untersuchung dieses Schemas nicht Ziel dieser Studie. Zudem handelt es sich bei den Tieren der Gruppe B um weiße Legehennen, deren Genetik sich von denen der braunen Legehennen unterscheidet (s. 2.5.3). Die Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen wäre daher eingeschränkt gewesen.

#### Zusammenfassung:

In der Regel wiesen die Tiere, die zusätzlich mit einem KV geimpft wurden, häufiger bzw. mehr Salmonellen in den Caeca und Kloakentupferproben auf als die Tiere, die ausschließlich mit MLV geimpft wurden. Demnach scheinen Impfschemata, die aus einer Kombination von MLV und KV bestehen, keinen effektiveren Schutz vor SE zu bieten als Impfschemata, die ausschließlich MLV beinhalten. Da die Tiere aus unterschiedlichen Herkunftsbetrieben stammten, lagen Variationen im Alter, äußeren Erscheinungsbild (Bemuskelung, Befiederung, makroskopische pathologische Veränderungen), Sozialverhalten und vermutlich auch in der Immunität der Tiere vor. Es ist daher anzunehmen, dass die Unterschiede in der Salmonellenresistenz der Tiere nicht ausschließlich auf die Impfungen zurückzuführen sind.



### 5.3 Versuchsdurchführung

Für den Salmonellen-Infektionsversuch dieser Studie wurden Legehennen fünf verschiedener sächsischer Legehennenhaltungen, die teilweise zu einem Unternehmen gehören (Gruppe C und E), verwendet. Die Tiere sind unter Feldbedingungen geschlüpft, aufgezogen, und entsprechend der zurzeit in Sachsen überwiegend angewandten Impfschemata geimpft worden. Das heißt, die Tiere waren mit dem Impfschutz versehen, den Legehennen tatsächlich im Feld erfahren. Da die MLV in den Betrieben über das Trinkwasser verabreicht werden und Küken insbesondere in den ersten Lebenstagen nicht immer regelmäßig trinken (ATTERBURY et al. 2010), kann nicht ausgeschlossen werden, dass nicht jedes Tier gleichermaßen immunisiert wurde.

Um den wissenschaftlichen Ansprüchen gerecht zu werden, wäre die Integration einer ungeimpften Kontrollgruppe in den Versuch wünschenswert gewesen. Da die Legehennenhaltung in Sachsen überwiegend in großen spezialisierten Betrieben mit mindestens 1000 Tieren erfolgt (PROPLANTA 2009), sind die Tiere entsprechend der Hühner-Salmonellen-VO (s. 2.3.2.1) gegen SE geimpft. Für die Bildung einer ungeimpften Kontrollgruppe hätten Legehennen aus Betrieben mit weniger als 350 Tieren oder Hühner aus Legehennen-Zuchtbetrieben verwendet werden müssen. Dies hätte zu bedeutenden haltungsbedingten Unterschieden zwischen den Tieren der fünf Experimentalgruppen und der Kontrollgruppe geführt. Die wissenschaftlichen Ansprüche an eine Kontrollgruppe wären damit nicht erfüllt worden.

Da die Ergebnisse einer Kontrollgruppe fehlen, kann nicht beurteilt werden, in welchem Maße die Impfung zur Immunität der Tiere beigetragen hat. Folglich kann auch keine Aussage über die Effizienz der einzelnen Impfschemata gemacht werden. Es konnte lediglich der Verlauf des Impfschutzes in den fünf Impfgruppen dargestellt werden. Da in anderen Infektionsversuchen unter vergleichbaren Bedingungen (Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Infektion, Infektionsdosis, Infektionsstamm) bei geimpften Legehennen ähnliche Ergebnisse für den qualitativen und quantitativen SE-Nachweis ermittelt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die in dieser Studie verwendeten Impfschemata A bis E einen vergleichbaren Immunschutz vor SE induzieren. Inwiefern von der Impfung unabhängige Faktoren (s. 5.1.4.2) diesen Immunschutz beeinflussen, kann nur vermutet werden. Um eindeutigere Aussagen treffen zu können, wären die Ergebnisse einer Kontrollgruppe von Bedeutung gewesen.

Wie dargestellt variierte der Zustand der Tiere (Befiederung, Bemuskelung, Sozialverhalten). Während der Adaptionsphase von einer Woche sollten sich die Tiere vom Transportstress erholen und sich an den Stall und das Pflegepersonal gewöhnen, um zum Zeitpunkt der Infektion keinem zusätzlichen Stress ausgesetzt zu werden. Zudem sollte sich der Zustand der Tiere unter den standardisierten Bedingungen im Infektionsstall angleichen. Wie beschrieben lagen bereits zur Einstellung teilweise pathologische Befunde vor, die u.a. auf vorhergehende Krankheiten zurückzuführen sind.

Unter Verwendung der natürlichen Eintrittspforte wurden die Tiere oral mit  $1,0 \times 10^9$  KbE SE je Tier infiziert. Um sicherzustellen, dass jedes Tier die gleiche Infektionsdosis erhielt, wurden die Erreger direkt in den Kropf instilliert. Unter Feldbedingungen ist die Infektionsdosis niedriger, die Tiere sind dem Erreger (z.B. in kontaminiertem Futter) meist jedoch über einen längeren Zeitraum ausgesetzt. Zudem sind die Hygienestandards, beispielsweise die Sauberkeit der Einstreu, in den Betrieben in der Regel niedriger als im Infektionsstall, d.h. der Erreger kann sich unter Feldbedingungen besser vermehren und verbreiten. Die Abhängigkeit des Infektionsverlaufes vom Salmonellenstamm wurde bereits erwähnt (METHNER et al. 1995b; OKAMURA et al. 2001). Salmonellen-Wildstämme, die an das Überleben in der Umwelt bzw. den Hühnerorganismus angepasst sind, sind meist resistenter und invasiver als Laborstämme wie dem für diese Studie verwendeten Infektionsstamm. ATTERBURY et al. (2009) infizierten Legehennen für ihre Studie zur Wirksamkeit von MLV und KV daher mit einem SE-Feldstamm (ATTERBURY et al. 2009). Um das natürliche Infektionsgeschehen nachzuahmen, wurde in anderen Studien das „seeder-bird“-Modell verwendet (CAMERON und CARTER 1992; BOHEZ et al. 2008). Dabei wird nur ein Teil der Versuchstiere infiziert und zu einer Gruppe von naiven Tieren gesetzt. Durch den Kontakt zu den infizierten Tieren und deren Kot können sich die anderen Versuchstiere mit dem Erreger infizieren. Eine Standardisierung der Infektion ist damit nicht gegeben. In der vorliegenden Studie wäre die Vergleichbarkeit der Ergebnisse des Salmonellennachweises zwischen den verschiedenen Versuchszeitpunkten bzw. den Impfschemata (A vs. D und C vs. E) unter diesen Infektionsbedingungen daher eingeschränkt gewesen. Zudem war die Prüfung der Effizienz der verschiedenen Impfschemata unter natürlichen Infektionsbedingungen nicht Ziel der vorliegenden Studie. Um Salmonellen auch in den Reproduktionsorganen nachweisen zu können, sind bei oraler Infektion hohe Infektionsdosen von  $1,0 \times 10^9$  KbE SE je Tier oder intravenöse Infektionen, insbesondere bei geimpften Tieren, notwendig (BARROW und LOVELL 1991; KINDE et al. 2000; GAST et al. 2002). Mit dem „seeder-bird“-Modell wäre eine entsprechend hohe Infektionsdosis nicht erreicht worden und damit ein Nachweis von SE in den Reproduktionsorganen schwierig bzw. nicht möglich gewesen.

Da es sich in dieser Studie um einen Tierversuch handelt (s. 3.1.2), musste die Anzahl der Versuchstiere aus Gründen des Tierschutzes weitgehend reduziert werden. Auch aus diesem Grund wäre die Umsetzung der „seeder-bird“-Methode nicht möglich gewesen, da hierfür größere Tierzahlen benötigt werden, um ein geeignetes Verhältnis von Infektionstieren und naiven Tieren herzustellen. Für das Infektionsmodell der vorliegenden Studie wurde die kleinste noch auswertbare Tierzahl von sechs Tieren je Gruppe und Beprobungszeitpunkt angenommen. Der statistischen Auswertung standen daher nur geringe Tierzahlen (die durch das vorzeitige Versterben von zwei Tieren in der 69. LW zusätzlich reduziert wurden) zur Verfügung. Folglich hatten schon geringfügige Unterschiede verhältnismäßig großen Einfluss auf die statistischen Ergebnisse.

Die bakteriologische quantitative Organuntersuchung eignete sich auch bei der Verwendung kleinerer Tierzahlen für eine relativ detaillierte Information über den Infektionsverlauf und für die Feststellung von auch nur geringen Unterschieden zwischen den verschiedenen Impfgruppen. METHNER et al. (1995b), die ein „Modell zur experimentellen Wirksamkeitsprüfung von Bekämpfungsmaßnahmen gegen Salmonelleninfektionen beim Huhn“ erarbeiteten, verwendeten entsprechend kleine Tierzahlen und kamen zu der gleichen Schlussfolgerung. Die qualitative Untersuchung war insbesondere für den Nachweis subletal geschädigter Salmonellen und mit einer hohen Begleitflora konkurrierenden Salmonellen von Bedeutung, um möglichst alle Salmonellen zu erfassen.

Um die Ergebnisse dieser Studie auszubauen bzw. zu bestätigen, wäre die - allerdings sehr aufwendige und teure (EFSA 2004) - Durchführung von Feldstudien mit größeren Tierzahlen zur Untersuchung der Impfschemata unter ausschließlich realen Bedingungen (tatsächliche Immunität der Tiere im Feld, natürliche Infektion, ausschließlich Feldbedingungen) erstrebenswert. Die Einführung einer Kontrollgruppe wäre sinnvoll, jedoch ebenso wie in dieser Studie schwierig umzusetzen. Einerseits könnte mithilfe einer Kontrollgruppe die Wirksamkeit der verschiedenen Impfschemata beurteilt werden. Andererseits könnten die Effekte, die die Impfungen auf die Immunität der Legehennen haben von den Effekten abgegrenzt werden, die auf Faktoren zurückzuführen sind, die unabhängig von der Impfung sind und Einfluss auf die Immunität haben (Legeleistung, Sozialverhalten, Umgebungstemperatur).

#### Zusammenfassung:

Die Ergebnisse dieser Studie dienen der Einschätzung des Verlaufs des durch die verschiedenen in Sachsen angewandten Impfschemata induzierten Schutzes vor SE und geben Hinweise auf Unterschiede in der Wirksamkeit der Impfschemata (MLV vs. MLV und KV). Die verwendeten Tiere entstammten Feldbedingungen, die Infektion fand jedoch unter experimentellen Bedingungen statt, um den Vergleich der Ergebnisse der drei Versuchszeitpunkte bzw. Gruppen zu ermöglichen. Für den Ausbau bzw. die Bestätigung der Ergebnisse dieser Studie wäre die Durchführung von Feldstudien zur Untersuchung der Impfschemata unter ausschließlich realen Bedingungen erstrebenswert. Die Einführung einer Kontrollgruppe wäre sinnvoll, jedoch ebenso wie in dieser Studie schwierig umzusetzen, da in den sächsischen Legehennenhaltungen aufgrund der hohen Tierzahlen in der Regel gegen *S. Enteritidis* geimpft wird (Impfpflicht in Betrieben mit > 350 Tieren). Einerseits könnte dadurch die Wirksamkeit der verschiedenen Impfschemata beurteilt werden, andererseits könnten die Effekte der Impfungen von den Effekten der Faktoren (Legeleistung, Sozialverhalten, Umgebungstemperatur, Altersresistenz), die unabhängig von der Impfung Einfluss auf die Immunität haben, abgegrenzt werden.

## 5.4 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Studie wurden die zurzeit in Sachsen angewandten Impfstrategien mit MLV und einer Kombinationsimpfung von MLV und KV auf den Verlauf der Schutzwirkung vor Salmonellen insbesondere gegen Ende der Legeperiode untersucht, sowie mögliche Unterschiede in der Schutzwirkung zwischen den Impfschemata, die ausschließlich MLV umfassen, und den Impfschemata, die aus einer Kombination von MLV und KV bestehen, geprüft.

Die Immunität der Legehennen, die gemäß der in Sachsen angewandten Impfschemata B bis E geimpft worden waren, schien mit dem Alter der Tiere nicht nachzulassen. Zum Versuchszeitpunkt 54. LW waren die Tiere stärker mit Salmonellen belastet als in der 69. LW. Impfgruppe A wies in der 69. LW mehr Salmonellen auf als in der 39. und 54. LW, was auf ein Nachlassen der Impfung und möglicherweise auf den im Vergleich zu den vorhergehenden Versuchszeitpunkten reduzierten Zustand der Tiere zurückzuführen ist. Diese zum Ende der Legeperiode zunehmende Salmonellenabwehr ist vermutlich nicht ausschließlich auf die Effizienz der angewandten Impfschemata zurückzuführen, sondern auch auf davon unabhängige Faktoren (Temperatureinflüsse, Legestress, Altersresistenz). Ergebnisse ungeimpfter Kontrolltiere zur Beurteilung dieser Faktoren fehlen.

Bei den Tieren, die gemäß einem kombinierten Impfschema (MLV + KV) geimpft worden waren, waren in den Kloakentupfern und tendenziell in den Caeca häufiger bzw. mehr Salmonellen nachzuweisen als bei den Tieren, die ausschließlich mit MLV geimpft worden waren. Dieses Ergebnis führt zu der Annahme, dass die Zusatzimpfung mit einem KV weder nötig noch sinnvoll ist. Da die Tiere der Impfgruppen, die verglichen wurden, aus verschiedenen Herkunftsbetrieben stammten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch haltungsbedingte Effekte (Sozialverhalten, körperlicher Zustand) die Immunität der Tiere beeinflussten.

Diese Studie konnte wie auch andere Studien zeigen, dass eine Impfung gegen SE insbesondere bei hohen Infektionsdosen (experimentelle Infektion, hoher Infektionsdruck durch infizierte Schadnager oder defiziente Reinigung und Desinfektion in den Betrieben) keine Erregerfreiheit garantiert (EFSA 2004; ATTERBURY et al. 2009). Eine Impfung allein ist nicht ausreichend. Die Schutzwirkung einer Impfung ist am besten, wenn die Salmonellen-Exposition gering ist (DAVIES und BRESLIN 2003b), d.h. wenn sie Bestandteil eines ausgewogenen Bekämpfungsprogramms darstellt (NASSAR et al. 1994). Zudem besteht durch die konsequente Impfung gegen bestimmte Serovare (SE und teilweise STM) die Gefahr der Selektion anderer Salmonellen-Serovare (HAFEZ 2001). Ein solides vielseitiges Bekämpfungsprogramm (Bekämpfungsmaßnahmen s. 0) kann dieser Gefahr frühzeitig Einhalt gewähren. Entsprechend stellen Monitoring-Programme ein wichtiges System zur Erkennung von epidemiologischen Veränderungen des Salmonellenvorkommens dar, wodurch ein frühzeitiges Eingreifen ermöglicht wird (HAFEZ 2010). Weiterhin scheint eine selektive Zucht auf resistente Hühnerlinien sinnvoll zu sein. Auch in der

vorliegenden Studie zählten die Tiere der genetisch bedingt resistenteren Linie (Gruppe B) zu den tendenziell besser geschützten Tieren. Gesunde, weder durch soziale noch äußere Faktoren (Temperatur, Krankheiten, Leistung) gestresste Hühner eliminieren die Salmonelleninfektion besser und schneller als gestresste und damit geschwächte Tiere. Eine adäquate Haltung sollte daher stets in ein verantwortungsbewusstes Bekämpfungsprogramm integriert werden.

Da Salmonellen sehr anpassungs- und widerstandsfähig sind, können trotz intensiver Bekämpfungsmaßnahmen Erreger in die Nahrungsmittelkette gelangen. In jeder der Impfgruppen konnte zumindest vereinzelt SE in den Reproduktionstrakten nachgewiesen werden, d.h. die Möglichkeit zur Kontamination von Eiinhalt war gegeben. Daher ist auch die Aufklärung des Verbrauchers über mögliche Gefahren durch eine Infektion mit Salmonellen sowie über Schutzmaßnahmen, um einer Infektion vorzubeugen, von großer Bedeutung (HAFEZ 2010).

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Cornelia Käser

### **Untersuchung verschiedener in Sachsen angewandter Impfstrategien zur Vorbeugung der *Salmonella* Enteritidis-Infektion in Legehennenbeständen**

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im Dezember 2011

96 Seiten, 31 Abbildungen, 9 Tabellen, 272 Literaturstellen

Schlüsselwörter: *Salmonella* Enteritidis, Legehenne, Lebendimpfstoffe, Inaktivimpfstoffe, experimentelle Infektion

In der vorliegenden Arbeit wurde einerseits der Verlauf der Schutzwirkung der zurzeit in Sachsens Legehennenbeständen überwiegend angewandten Impfschemata gegen *Salmonella* Enteritidis (SE) untersucht. Andererseits wurden die Impfschemata, die ausschließlich modifizierte Lebendimpfstoffe (MLV) umfassen, und Impfschemata, die aus einer Kombination von MLV und Inaktivimpfstoffen (KV) bestehen, auf Unterschiede in der Wirksamkeit geprüft.

Um die Wirksamkeit der Impfschemata im Verlauf der Legeperiode und im Vergleich miteinander untersuchen zu können, wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten der Legeperiode (39., 54. und 69. Lebenswoche (LW)) Infektionsversuche mit einem Nalidixinsäure-resistenten SE-Stamm durchgeführt. Es wurden insgesamt 180 Legehennen verwendet, die in fünf verschiedenen Herkunftsbetrieben etwa gleicher Größe aufgezogen und geimpft worden waren. In jedem der Herkunftsbetriebe wurde eines von fünf Impfschemata (A bis E) angewendet. Die Impfschemata A und C beinhalteten ausschließlich MLV, die Impfschemata B, D und E eine Kombination aus MLV und KV. Zu den genannten Zeitpunkten (39., 54. und 69. LW) wurden jeweils zwölf Tiere aus den Betrieben in den Infektionsstall des Instituts für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen verbracht und eingestallt. Nach der Adaptionsphase von einer Woche und der Prüfung der Tiere auf Salmonellenfreiheit wurde jedes Tier mit  $1,0 \times 10^9$  KbE SE oral infiziert. Zwei und sieben Tage *post infectionem* (*p.inf.*) wurden jeweils sechs Hennen euthanasiert und seziert. Caeca, Leber-, Ovar- und Oviduktproben wurden entnommen und gemäß anerkannter quantitativer und qualitativer Untersuchungsmethoden auf den Infektionsstamm untersucht. Zur Kontrolle der Erregerausscheidung wurden ein, drei und fünf Tage *p.inf.* Kloakentupferproben von jedem Tier entnommen und entsprechend auf SE untersucht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen variierten in Abhängigkeit von Versuchs- und Sektions- bzw. Kloakentupferentnahmezeitpunkt, untersuchtem Organ sowie quantitativer und qualitativer Untersuchung. Die ausschließlich mit MLV geimpften Gruppen A und C wiesen im Vergleich zu den Gruppen D und E, die mit demselben MLV und zusätzlich mit einem KV geimpft worden waren, in den Kloakentupfer- und Caecumproben in der Regel qualitativ und quantitativ weniger Salmonellen auf. Der Salmonellennachweis in den Leberproben und den vereinzelt besiedelten Reproduktionsorganen variierte nur geringfügig zwischen den Impfgruppen. Da die Tiere der vier Impfgruppen aus jeweils anderen Herkunftsbetrieben stammten, sind haltungsbedingte Unterschiede anzunehmen. Das äußere Erscheinungsbild (Befiederung, Bemuskulung, makroskopische pathologische Veränderungen) und das Sozialverhalten der Tiere variierten, was mit Unterschieden in der Immunität einhergehen kann. Bei den Tieren der Gruppe A bzw. C waren in der 69. LW und in 54. LW, respektive, ein ausgeprägtes kannibalistisches Verhalten und dessen Konsequenzen (reduzierte Wasser- und Futteraufnahme der gepickten Tiere, Hackverletzungen) zu beobachten.

Tendenziell waren die Tiere der Gruppen B bis E in der 54. LW stärker mit SE belastet als in der 39. und 69. LW. Ein Einfluss der unter Umständen erhöhten Umgebungstemperaturen in den Betrieben sowie des hohen Leistungsstress während der mittleren Phase der Legeperiode auf die Immunität der 54 LW alten Tiere, die im August 2010 infiziert wurden, ist nicht auszuschließen. Auch eine sich ausbildende Altersresistenz könnte die bessere Salmonellenabwehr der 69 LW alten Tiere erklären. Tiere der Gruppe A waren jedoch in der 69. LW am stärksten mit SE belastet, was auf ein Nachlassen der durch die Impfung induzierten Immunität und möglicherweise auf den im Vergleich zu den jüngeren Tieren allgemein schwächeren Zustand der Tiere zurückzuführen ist. Die Ergebnisse einer Kontrollgruppe zur Beurteilung der von der Impfung unabhängigen Faktoren fehlen. Da in den sächsischen Legehennenhaltungen aufgrund der hohen Tierzahlen entsprechend der Hühner-Salmonellen Verordnung (Impfpflicht für Betriebe mit mehr als 350 Tieren) gegen SE geimpft wird, hätten zur Bildung einer ungeimpften Kontrollgruppe Tiere aus kleineren Betrieben oder Zuchttierhaltungen mit völlig anderen Haltungsstrukturen verwendet werden müssen. Damit wären die wissenschaftlichen Ansprüche an eine Kontrollgruppe jedoch nicht erfüllt worden.

Entsprechend der Ergebnisse und Umstände dieser Studie scheint eine Zusatzimpfung mit einem KV im Vergleich zu einer Impfung mit ausschließlich MLV keinen Vorteil im Schutz vor SE zu bieten. Es konnte gezeigt werden, dass die Immunität der gemäß der Impfschemata B bis E geimpften Legehennen gegen SE am Ende der Legeperiode nicht nachlässt.

Die Impfung allein kann den Erreger nicht eliminieren und muss daher stets in ein verantwortungsvolles und vielseitiges Bekämpfungsprogramm integriert werden.

## 7 SUMMARY

Cornelia Käser

### **Investigation of different vaccination programmes applied in Saxony to prevent *Salmonella* Enteritidis infection in laying hen flocks**

Institute for Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, Faculty of Veterinary Medicine

Submitted in December 2011

96 pages, 31 figures, 9 tables, 272 references

Keywords: *Salmonella* Enteritidis, laying hen, live vaccine, inactivated vaccine, experimental infection

The aim of the study was to determine the differences in the efficacy of vaccination programmes consisting of only modified live vaccines (MLV) and those consisting of MLV and supplementary inactivated vaccines (KV) currently applied to laying hen flocks in Saxony, Germany, against *Salmonella* Enteritidis (SE). Furthermore, the course of immunity provided by the vaccination programmes was investigated.

In order to determine the efficacy of the vaccination programmes during the laying period and to define the differences in the efficacy between the vaccination programmes, laying hens were challenged with a nalidixic acid resistant SE strain during the 39<sup>th</sup>, 54<sup>th</sup> and 69<sup>th</sup> week of age. Altogether, 180 laying hens which had been raised and vaccinated in five different commercial laying hen farms were used. In each farm, one of the five vaccination programmes (A to E) was applied. The vaccination programmes A and C exclusively consisted of MLV. The vaccination programmes B, D and E consisted of a combination of MLV and KV. At the given points in time (39<sup>th</sup>, 54<sup>th</sup> and 69<sup>th</sup> week of age), twelve laying hens from each farm were acquired and housed in isolation facilities of the Institute for Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Leipzig. After one week of adaptation and testing negative for *Salmonella*, animals were orally challenged with  $1,0 \times 10^9$  cfu SE. Six hens of each group were euthanized and dissected on day two and seven post challenge. Caeca, liver-, ovary- and oviduct samples were withdrawn and examined for SE in correspondence with previously acknowledged quantitative and qualitative methods. In order to control faecal excretion, cloacal swabs of each hen were withdrawn one, two and five days post challenge and likewise examined for SE.

The results varied depending on the age of the animals, the point in time of dissection and withdrawal time of cloacal swabs, the organ that had been investigated and the quantitative



or qualitative examination. In groups A and C, which had been exclusively vaccinated with MLV, *Salmonella* was generally detected to be less frequent and in smaller amounts in the caecal and cloacal swab samples than in groups D and E, which had been vaccinated with the corresponding MLV and supplementary KV. The results of both rarely colonised reproductive tissue as well as liver samples varied only slightly between the groups. Since the laying hens were from various flocks, differences that were due to husbandry effects were likely. Visual inspection confirmed that laying hens varied in their visual appearance (plumage, muscling, macroscopic pathological changes). Also, it may be assumed that they were in different health conditions, including immune status. In group A (in their 69<sup>th</sup> week of age) and group C (in their 54<sup>th</sup> week of age), cannibalistic behaviour and its consequences (water and food withdrawal for pecked animals, pecking wounds) were observed. It is evident that these circumstances can influence the resistance against *Salmonella* infection.

In their 54<sup>th</sup> week of age, the animals in groups B to E tended to be more heavily burdened by SE than animals in their 39<sup>th</sup> and 69<sup>th</sup> week of age. The increased temperatures which were potentially present in the laying hen flocks probably influenced the animals that were in their 54<sup>th</sup> week of age before their infection in August 2010. Additionally, stress caused by increased laying performance during the mid-time phase of the laying period also might have had an impact. Also, a forming age resistance could explain the better defense of the animals in their 69<sup>th</sup> week of age. However, animals in group A were most heavily burdened in their 69<sup>th</sup> week of age. This can be attributed to a decrease of immunity provided by the vaccination as well as a reduced physical and behavioural state compared to the younger animals.

Results of a control group that evaluates the factors independent from the vaccination were missing. As Saxon laying hen flocks usually host more than 350 laying hens, animals are vaccinated against SE as stipulated in the "Hühner-Salmonellen Verordnung". In order to form a control group containing laying hens which had not yet received vaccination, animals would have to be taken from smaller or breeder hen flocks. Those raise animals in completely different husbandry structures which do not reflect the major picture of laying flocks in Saxony such that a comparison seemed not reasonable.

Corresponding with the results of our study, we conclude that the double protection of both KV and MLV provide no advantage over the use of only MLV. We demonstrated that the immunity of the laying hens vaccinated according to the investigated vaccination programmes B to E in this study does not decrease at the end of the laying period.

Vaccination cannot eliminate *Salmonella* and, as a consequence, has to be integrated into responsible hygiene and husbandry management practices.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

Anon. Richtlinie des Rates vom 15. Oktober 1990 über die tierseuchenrechtlichen Bedingungen für den innergemeinschaftlichen Handel mit Geflügel und Bruteiern für ihre Einfuhr aus Drittländern (90/539/EWG) (1990).

Anon. Validation List no. 102, Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSEM. Int J Syst Evol Microbiol. 2005;55:547-9.

Anon. Verordnung (EG) Nr. 2160/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 17. November 2003 zur Bekämpfung von Salmonellen und bestimmten anderen durch Lebensmittel übertragbaren Zoonoseerregern (2003).

Anon. Verordnung zum Schutz gegen bestimmte Salmonellen-infektionen beim Haushuhn (Hühner-Salmonellen-VO) vom 06. April 2009 (2009).

Andrews-Polymenis H, Dorsey C, Raffatellu M, Bäumler A. In vivo identification, expresion and function of Salmonella virulence genes. In: Maskell D, Mastroeni P, (Hrsg.). Salmonella Infections, clinical, immunological and molecular aspects. Cambridge: Cambridge University Press; 2006: 173-206.

Arnold J, Holt P. Response to *Salmonella*-Enteritidis Infection by the Immunocompromised Avian Host. Poult Sci. 1995;74(4):656-65.

Atterbury R, Carrique-Mas J, Davies R, Allen V. *Salmonella* colonisation of laying hens following vaccination with killed and live attenuated commercial Salmonella vaccines. Vet Rec. 2009;165(17):493-496.

Atterbury R, Davies R, Carrique-Mas J, Morris V, Harrison D, Tucker V et al. Effect of delivery method on the efficacy of *Salmonella* vaccination in chickens. Vet Rec. 2010;167(5):161-4.

Babu U, Scott M, Myers M, Okamura M, Gaines D, Yancy H et al. Effects of live attenuated and killed *Salmonella* vaccine on T-lymphocyte mediated immunity in laying hens. Vet Immunol Immunopathol. 2003;91(1):39-44.

Babu U, Dalloul R, Okamura M, Lillehoj H, Xie H, Raybourne R et al. *Salmonella* Enteritidis clearance and immune responses in chickens following *Salmonella* vaccination and challenge. Vet Immunol Immunopathol. 2004;101(3-4):251-7.

Bailey J. Factors Affecting Microbial Competitive-Exclusion in Poultry. Food Technology. 1987;41(7):88-92.

Bailey J, Blankenship L, Cox N. Effect of Fructooligosaccharide on *Salmonella* Colonization of the Chicken Intestine. Poult Sci. 1991;70(12):2433-8.

Bar-Shira E, Sklan D, Friedman A. Establishment of immune competence in the avian GALT during the immediate post-hatch period. Dev Comp Immunol. 2003;27(2):147-57.

Barbezange C, Ermel G, Ragimbeau C, Humbert F, Salvat G. Some safety aspects of *Salmonella* vaccines for poultry: in vivo study of the genetic stability of three *Salmonella* Typhimurium live vaccines. Fems Microbiology Letters. 2000;192(1):101-6.

Barnes EM, Impey CS, Cooper DM. Manipulation of the Crop and Intestinal Flora of the Newly Hatched Chick. Am J Clin Nutr. 1980;33(11):2426-33.

- Barrow P, Huggins M, Lovell M, Simpson J. Observations on the Pathogenesis of Experimental *Salmonella* Typhimurium Infection in Chickens. *Res Vet Sci*. 1987;42(2):194-9.
- Barrow P, Hassan J, Berchieri A. Reduction in Fecal Excretion of *Salmonella* Typhimurium Strain F98 in Chickens Vaccinated with Live and Killed *Salmonella* Typhimurium Organisms. *Epidemiol Infect*. 1990a;104(3):413-26.
- Barrow P, Hassan J, Lovell M, Berchieri A. Vaccination of Chickens with *aroA* and Other Mutants of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis. *Res Microbiol*. 1990b;141(7-8):851-3.
- Barrow P. Experimental-Infection of Chickens with *Salmonella* Enteritidis. *Avian Pathol*. 1991;20(1):145-53.
- Barrow P, Lovell M. Experimental-Infection of Egg-Laying Hens with *Salmonella* Enteritidis Phage Type-4. *Avian Pathol*. 1991;20(2):335-48.
- Barrow P, Lovell M, Berchieri A. The Use of 2 Live Attenuated Vaccines to Immunize Egg-Laying Hens Against *Salmonella* Enteritidis Phage Type-4. *Avian Pathol*. 1991;20(4):681-92.
- Barrow P. Further Observations on the Serological Response to Experimental *Salmonella* Typhimurium in Chickens Measured by Elisa. *Epidemiol Infect*. 1992;108(2):231-41.
- Barrow P, Huggins M, Lovell M. Host-Specificity of *Salmonella* Infection in Chickens and Mice Is Expressed In-Vivo Primarily at the Level of the Reticuloendothelial System. *Infect Immun*. 1994;62(10):4602-10.
- Barrow P. *Salmonella* infections: immune and non-immune protection with vaccines. *Avian Pathol*. 2007;36(1):1-13.
- Beal R, Wigley P, Powers C, Hulme SD, Barrow PA, Smith AL. Age at primary infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken influences persistence of infection and subsequent immunity to re-challenge. *Vet Immunol Immunopathol*. 2004a;100(3-4):151-64.
- Beal R, Powers C, Wigley P, Barrow P, Smith A. Temporal dynamics of the cellular, humoral and cytokine responses in chickens during primary and secondary infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Avian Pathol*. 2004b;33(1):25-33.
- Beal R, Powers C, Wigley P, Barrow P, Kaiser P, Smith A. A strong antigen-specific T-cell response is associated with age and genetically dependent resistance to avian enteric Salmonellosis. *Infect Immun*. 2005;73(11):7509-16.
- Beal R, Powers C, Davison T, Barrow P, Smith A. Clearance of enteric *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in chickens is independent of B-cell function. *Infect Immun*. 2006a;74(2):1442-4.
- Beal R, Wigley R, Powers C, Barrow P, Smith A. Cross-reactive cellular and humoral immune responses to *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis are associated with protection to heterologous re-challenge. *Vet Immunol Immunopathol*. 2006b;114(1-2):84-93.
- Beal R, Smith A. Antibody response to *Salmonella*: its induction and role in protection against avian enteric salmonellosis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2007;5(5):873-81.

- Beaumont C, Chapuis H, Protais J, Sellier N, Menanteau P, Fravalo P et al. Resistance to *Salmonella* carrier state: selection may be efficient but response depends on animal's age. *Genetics Research*. 2009;91(3):161-9.
- Berndt A, Methner U. Gamma/delta T cell response of chickens after oral administration of attenuated and non-attenuated *Salmonella* Typhimurium strains. *Vet Immunol Immunopathol*. 2001;78(2):143-61.
- Berndt A, Wilhelm A, Jugert C, Pieper J, Sachse K, Methner U. Chicken Cecum Immune Response to *Salmonella enterica* Serovars of Different Levels of Invasiveness. *Infect Immun*. 2007;75(12):5993-6007.
- Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). Salmonellen und ihre Bedeutung als Krankheitserreger; (zitiert vom 11.11.2010). <<http://www.bfr.bund.de/cd/537>>.
- Bichler L, Nagaraja K, Halvorsen D. *Salmonella* Enteritidis in eggs, cloacal swab specimens, and internal organs of experimentally infected White Leghorn chickens. *Am J Vet Res*. 1996;57(4):489-95.
- Bohez L, Dewulf J, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Van Immerseel F. The effect of oral administration of a homologous hilA mutant strain on the long-term colonization and transmission of *Salmonella* Enteritidis in broiler chickens. *Vaccine*. 2008;26(3):372-8.
- Burkholder K, Thompson K, Einstein M, Applegate T, Patterson J. Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology, and susceptibility to *Salmonella* Enteritidis colonization in broilers. *Poult Sci*. 2008;87(9):1734-41.
- Bygrave AC, Gallagher J. Transmission of *Salmonella* Enteritidis in Poultry. *Vet Rec*. 1989;124(21):571.
- Calenge F, Kaiser P, Vignal A, Beaumont C. Genetic control of resistance to salmonellosis and to *Salmonella* carrier-state in fowl: a review. *Genet Sel Evol*. 2010;42(11).
- Cameron D, Carter J. Evaluation of the Efficacy of Broilact(R) in Preventing Infection of Broiler Chicks with *Salmonella* Enteritidis Pt4. *Int J Food Microbiol*. 1992;15(3-4):319-26.
- Carvajal B, Methner U, Pieper J, Berndt A. Effects of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis on cellular recruitment and cytokine gene expression in caecum of vaccinated chickens. *Vaccine*. 2008;26(42):5423-33.
- Cerquetti M, Gherardi M. Orally administered attenuated *Salmonella* Enteritidis reduces chicken cecal carriage of virulent *Salmonella* challenge organisms. *Vet Microbiol*. 2000a;76(2):185-92.
- Cerquetti M, Gherardi M. Vaccination of chickens with a temperature-sensitive mutant of *Salmonella* Enteritidis. *Vaccine*. 2000b;18(11-12):1140-5.
- Chappell L, Kaiser P, Barrow P, Jones M, Johnston C, Wigley P. The immunobiology of avian systemic salmonellosis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009; 128(1-3):53-9.
- Chart H, Rowe B, Baskerville A, Humphrey T. Serological Response of Chickens to *Salmonella* Enteritidis Infection. *Epidemiol Infect*. 1990;104(1):63-71.
- Cheminay C, Mohlenbrink A, Hensel M. Intracellular *Salmonella* inhibit antigen presentation by dendritic cells. *J Immunol*. 2005;174(5):2892-9.

Chew B. Importance of antioxidant vitamins in immunity and health in animals. *Animal Feed Science and Technology*. 1996;59(1-3):103-14.

Clavijo R, Loui C, Andersen G, Riley L, Lu S. Identification of genes associated with survival of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicken egg albumen. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(2):1055-64.

Clifton-Hadley F, Breslin M, Venables L, Springs K, Cooles S, Houghton S et al. A laboratory study of an inactivated bivalent iron restricted *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium dual vaccine against Typhimurium challenge in chickens. *Vet Microbiol*. 2002;89(2-3):167-79.

Cogan T, Humphrey T. The rise and fall of *Salmonella* Enteritidis in the UK. *J Appl Microbiol*. 2003;94:114-9.

Cooper G, Nicholas R, Cullen G, Hormaeche C. Vaccination of Chickens with a *Salmonella* Enteritidis *aroA* Live Oral Salmonella Vaccine. *Microb Pathog*. 1990;9(4):255-65.

Cooper G, Venables L, Woodward M, Hormaeche C. Vaccination of chickens with strain CVL30, a genetically defined *Salmonella* Enteritidis *aroA* live oral vaccine candidate. *Infect Immun*. 1994;62(11):4747-54.

Cowden JM, Lynch D, Joseph CA, Omahony M, Mawer SL, Rowe B et al. Case-Control Study of Infections with *Salmonella* Enteritidis Phage Type-4 in England. *BMJ*. 1989;299(6702):771-3.

Crespo P, Hernandez G, Echeita A, Torres A, Ordonez P, Aladuena A. Surveillance of foodborne disease outbreaks associated with consumption of eggs and egg products: Spain, 2002 - 2003. *Eurosurveillance*. 2005;10(24).

Curtiss RI, Kelly S, Hassan J. Live oral avirulent *Salmonella* vaccines. *Vet Microbiol*. 1993;37(3-4):397-405.

Curtiss RI, Hassan J. Nonrecombinant and recombinant avirulent *Salmonella* vaccines for poultry. *Vet Immunol Immunopathol*. 1996;54(1-4):365-72.

Darji A, Guzman C, Gerstel B, Wachholz P, Timmis K, Wehland J et al. Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. Typhimurium*. *Cell*. 1997;91(6):765-75.

Davies R, Wray C. Mice as carriers of *Salmonella* Enteritidis on persistently infected poultry units. *Vet Rec*. 1995;137(14):337-41.

Davies R, Wray C. Persistence of *Salmonella* Enteritidis in poultry units and poultry food. *Br Poult Sci*. 1996;37(3):589-96.

Davies R, Breslin M. Effects of vaccination and other preventive methods for *Salmonella* Enteritidis on commercial laying chicken farms. *Vet Rec*. 2003a;153(22):673-7.

Davies R, Breslin M. Observations on *Salmonella* contamination of commercial laying farms before and after cleaning and disinfection. *Vet Rec*. 2003b;152(10):283-7.

Davies R, Breslin M. Observations on *Salmonella* contamination of eggs from infected commercial laying flocks where vaccination for *Salmonella enterica* serovar Enteritidis had been used. *Avian Pathol*. 2004;33(2):133-44.

Davison F, Magor K, Kaspers B. Structure and evolution of avian immunoglobulins. In: Davison F, Kaspers B, Schat K, (Hrsg.). Avian Immunol. London: Elsevier; 2008: 107-119.

De Buck J, Pasmans F, Van Immerseel F, Haesebrouck F, Ducatelle R. Tubular glands of the isthmus are the predominant colonization site of *Salmonella* Enteritidis in the upper oviduct of laying hens. Poult Sci. 2004a;83(3):352-8.

De Buck J, Van Immerseel F, Haesebrouck F, Ducatelle R. Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by *Salmonella*. J Appl Microbiol. 2004b;97(2):233-45.

De Kruif A, Hoedemaker M, Feldmann M, Mansfeld R. Infektionskrankheiten, Parasitosen und andere Erkrankungen. In: de Kruif A, Hoedemaker M, Feldmann M, Mansfeld R, (Hrsg.). Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Milchrind. Enke Verlag; 2006: 194-293.

De Reu K, Grijspeerd K, Heyndrickx M, Uyttendaele M, Debevere J, Herman L. Bacterial shell contamination in the egg collection chains of different housing systems for laying hens. Br Poult Sci. 2006;47(2):163-72.

Desmidt M, Ducatelle R, Haesebrouck F. Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis phage type four after experimental infection of young chickens. Vet Microbiol. 1997;56(1-2):99-109.

Desmidt M, Ducatelle R, Mast J, Goddeeris B, Kaspers B, Haesebrouck F. Role of the humoral immune system in *Salmonella* Enteritidis phage type four infection in chickens. Vet Immunol Immunopathol. 1998;63(4):355-67.

Dhillon A, Alisantosa B, Shivaprasad H, Jack O, Schaberg D. Pathogenicity of *Salmonella* Enteritidis phage types 4, 8, and 23 in broiler chicks. Avian Dis. 1999;43(3):506-15.

Dorea F, Cole D, Hofacre C, Zamperini K, Mathis D, Doyle M et al. Effect of *Salmonella* Vaccination of Breeder Chickens on Contamination of Broiler Chicken Carcasses in Integrated Poultry Operations. Appl Environ Microbiol. 2010;76(23):7820-5.

Duchet-Suchaux M, Mompert F, Berthelot F, Beaumont C, Lechopier P, Pardon P. Differences in frequency, level, and duration of cecal carriage between four outbred chicken lines infected orally with *Salmonella* Enteritidis. Avian Dis. 1997;41(3):559-67.

EFSA (Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the requests from the Commission related to the use of vaccines for the control of *Salmonella* in poultry. EFSA Journal 114. 2004.

EFSA (Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Antimicrobial Resistance in the European Union in 2004. (2005).

EFSA (Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit). Wissenschaftliches Gutachten zu einer quantitativen Abschätzung der Auswirkungen der Festlegung eines neuen Ziels für die Eindämmung von Salmonellen in Legehennen auf die öffentliche Gesundheit. EFSA Journal. 2010.

El-Lethey H, Huber-Eicher B, Jungi T. Exploration of stress-induced immunosuppression in chickens reveals both stress-resistant and stress-susceptible antigen responses. Vet Immunol and Immunopathol. 2003;95(3-4):91-101.

El-Lethey H, Aerni V, Jungi T, Wechsler B. Stress and feather pecking in laying hens in relation to housing conditions. Br Poult Sci. 2000;41(1):22-8.

El-Tras W, Tayel A, Samir A. Potential Zoonotic Pathways of *Salmonella* Enteritidis in Laying Farms. Vector-Borne and Zoonotic Dis. 2010;10(8):739-42.

Eriksson S, Lucchini S, Thompson A, Rhen M, Hinton J. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. Mol Microbiol. 2003;47(1):103-18.

Fadl A, Venkitanarayanan K, Khan M. Identification of *Salmonella* Enteritidis outer membrane proteins expressed during attachment to human intestinal epithelial cells. J Appl Microbiol. 2002;92(1):180-6.

Farnell M, El Halawani M, You S, McElroy A, Hargis B, Caldwell D. In vivo biologic effects of recombinant-turkey interferon-gamma in neonatal leghorn chicks: Protection against *Salmonella enteritidis* organ invasion. Avian Dis. 2001;45(2):473-8.

Feberwee A, de Vries T, Hartman E, de Wit J, Elbers A, de Jong W. Vaccination against *Salmonella* Enteritidis in Dutch commercial layer flocks with a vaccine based. On a live *Salmonella* Gallinarum 9R strain: Evaluation of efficacy, safety, and performance of serologic salmonella tests. Avian Dis. 2001;45(1):83-91.

Ferreiros C, Ferron L, Criado M. In vivo human immune response to transferrin-binding protein 2 and other iron-regulated proteins of *Neisseria meningitidis*. FEMS Immunol Med Microbiol. 1994;8(1):63-8.

Fischer I. Enter-net Quarterly Salmonella Report. Public Health LaboratoryService. 2001. <<http://www2.phls.co.uk/reports/latest.html>>

Friedman A, Bar-Shira E, Sklan D. Ontogeny of gut associated immune competence in the chick. Worlds Poult Sci J. 2003;59(2):209-19.

FSA (Food Standards Agency). *Salmonella* contamination of UK-produced shell eggs on retail sale. Food survey information sheet 50/04. 2004.

FSA (Food Standards Agency). Survey of *Salmonella* contamination of raw shell eggs used in catering premises in the UK. Food survey information sheet 05/07. 2007.

Fukutome K, Watarai S, Mukamoto M, Kodama H. Intestinal mucosal immune response in chickens following intraocular immunization with liposome-associated *Salmonella enterica* serovar Enteritidis antigen. Dev Comp Immunol. 2001;25(5-6):475-84.

Galyov E, Wood M, Rosqvist R, Mullan P, Watson P, Hedges S et al. A secreted effector protein of *Salmonella* Dublin is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa. Mol Microbiol. 1997;25(5):903-12.

Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Van Immerseel F. The *Salmonella* Enteritidis lipopolysaccharide biosynthesis gene *rfbH* is required for survival in egg albumen. Zoonoses Public Health. 2008a;56(3):145-9.

Gantois I, Ducatelle R, Timmermont L, Boyen F, Bohez L, Haesebrouck F et al. Oral immunisation of laying hens with the live vaccine strains of TAD *Salmonella* vac« E and TAD *Salmonella* vac« T reduces internal egg contamination with *Salmonella* Enteritidis. Vaccine. 2006;24(37-39):6250-5.

Gantois I, Eeckhaut V, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F. A comparative study on the pathogenesis of egg contamination by different serotypes of *Salmonella*. Avian Pathol. 2008b;37(4):399-406.

- Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Van Immerseel F. *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Genes Induced during Oviduct Colonization and Egg Contamination in Laying Hens. *Appl Environ Microbiol*. 2008c;74(21):6616-22.
- Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Gast R, Humphrey T et al. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS microbiol reviews*. 2009;33(4):718-38.
- Gast R, Beard C. Age-related changes in the persistence and pathogenicity of *Salmonella* Typhimurium in chicks. *Poult Sci*. 1989;68(11):1454-60.
- Gast R, Stone H, Holt P. Evaluation of the efficacy of oil-emulsion bacterins for reducing fecal shedding of *Salmonella* Enteritidis by laying hens. *Avian Dis*. 1993;37(4):1085-91.
- Gast R, Holt P. Assessing the frequency and consequences of *Salmonella* Enteritidis deposition on the egg yolk membrane. *Poult Sci*. 2001;80(7):997-1002.
- Gast R, Guard-Petter J, Holt P. Characteristics of *Salmonella* Enteritidis contamination in eggs after oral, aerosol, and intravenous inoculation of laying hens. *Avian Dis*. 2002;46(3):629-35.
- Gast R, Guard-Petter J, Holt P. Effect of prior serial in vivo passage on the frequency of *Salmonella* Enteritidis contamination in eggs from experimentally infected laying hens. *Avian Dis*. 2003;47(3):633-9.
- Gast R, Holt P, Guraya R. Effect of refrigeration on in vitro penetration of *Salmonella* Enteritidis through the egg yolk membrane. *J Food Prot*. 2006;69(6):1426-9.
- Gast R. Serotype-Specific and Serotype-Independent Strategies for Preharvest Control of Food-Borne *Salmonella* in Poultry. *Avian Dis*. 2007a;51(4):817-28.
- Gast R, Guraya R, Guard-Bouldin J, Holt PS. In vitro penetration of egg yolks by *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Heidelberg strains during thirty-six-hour ambient temperature storage. *Poult Sci*. 2007b;86(7):1431-5.
- Gherardi M, Gomez M, Garcia V, Sordelli D, Cerquetti M. *Salmonella* Enteritidis temperature-sensitive mutants protect mice against challenge with virulent *Salmonella* strains of different serotypes. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000;29(2):81-8.
- Göbel T, Kaspers B, Stangassinger M. NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken. *Int Immunol*. 2001;13(6):757-62.
- Goren E, Dejong W, Doornenbal P, Koopman J, Kennis H. Protection of Chicks Against *Salmonella* Infection Induced by Spray Application of Intestinal Microflora in the Hatchery. *Veterinary Quarterly*. 1984;6(2):73-9.
- Gradel K, Sayers A, avies R. Surface disinfection tests with *Salmonella* and a putative indicator bacterium, mimicking worst-case scenarios in poultry houses. *Poult Sci*. 2004;83(10):1636-43.
- Griffin H, Perry M, Gilbert A. Yolk formation. In: Freeman E, (Hrsg.). *Physiology and biochemistry of the domestic fowl*. Academic Press, New York; 1984: 345-378.
- Grimont P, Weill F. *Antigenic formulae of the Salmonella Serovars 2007 9th edition*. 2007.



- Guard-Petter J, Henzler D, Rahman M, Carlson R. On-farm monitoring of mouse-invasive *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and a model for its association with the production of contaminated eggs. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(4):1588-93.
- Guard-Petter J. The chicken, the egg and *Salmonella* Enteritidis. *Environ Microbiol.* 2001;3(7):421-30.
- Guard Petter J. Clinical and Veterinary Isolates of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Defective in Lipopolysaccharide. 2010.
- Hafez HM. *Salmonella* infections in poultry: diagnosis and control. *Periodicum Biologorum.* 2001a;103(2):103-13.
- Hafez HM, Mazaheri A, Edel A. Trials on the efficacy of *Salmonella* Enteritidis live and inactivated vaccine in layer flocks under field condition; 50th Western Poultry Disease conference; 2001b March 23-26; Davies, California.
- Hafez HM. *Salmonella* Infections in Poultry: Control Approaches in the European Union. *Vet Sci.* 2010;1(2):80-8.
- Hahn I. Ein Beitrag für den Verbraucherschutz: TAD *Salmonella* vac E-ein neuer Lebendimpfstoff für Hühner gegen *Salmonella* Enteritidis. *Lohmann Information.* 1999;3.
- Hassan J, Mockett A, Catty D, Barrow P. Infection and Reinfection of Chickens with *Salmonella* Typhimurium - Bacteriology and Immune-Responses. *Avian Dis.* 1991;35(4):809-19.
- Hassan JO, Curtiss R, III. Development and evaluation of an experimental vaccination program using a live avirulent *Salmonella* typhimurium strain to protect immunized chickens against challenge with homologous and heterologous *Salmonella* serotypes. *Infect Immun.* 1994;62(12):5519-27.
- Hassan J, Curtiss R, III. Effect of vaccination of hens with an avirulent strain of *Salmonella* Typhimurium on immunity of progeny challenged with wild-Type *Salmonella* strains. *Infect Immun.* 1996;64(3):938-44.
- Hassan J, Curtiss RI. Efficacy of a live avirulent *Salmonella* Typhimurium vaccine in preventing colonization and invasion of laying hens by *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis. *Avian Dis.* 1997;41(4):783-91.
- He G, Tian W, Qian N, Cheng A, Deng S. Quantitative studies of the distribution pattern for *Salmonella* Enteritidis in the internal organs of chicken after oral challenge by a real-time PCR. *Vet Res Commun.* 2010;34(8):669-76.
- Henderson S, Bounous D, Lee M. Early Events in the Pathogenesis of Avian Salmonellosis. *Infect Immun.* 1999;67(7):3580-6.
- Hensel M. Pathogenicity islands and virulence of *Salmonella enterica*. In: Mastroeni P, Maskell D, (Hrsg.). *Salmonella* Infections, clinical, immunological and molecular aspects. Cambridge: Cambridge University press; 2006: 146-172.
- Hess J, Ladel C, Miko D, Kaufmann S. *Salmonella* Typhimurium *aroA*(-) infection in gene-targeted immunodeficient mice - Major role of CD4(+) TCR-alpha beta cells and IFN-gamma in bacterial clearance independent of intracellular location. *J Immunol.* 1996;156(9):3321-6.
- Hinton M, Linton A. Control of *salmonella* infections in broiler chickens by the acid treatment of their feed. *Vet Rec.* 1988;123(16):416-21.

Hinton M, Mead GC. Salmonella Control in Poultry - the Need for the Satisfactory Evaluation of Probiotics for This Purpose - Opinion. Letters Appl Microbiol. 1991;13(2):49-50.

Hoop R, Pospischil A. Bacteriological, Serological, Histological and Immunohistochemical Findings in Laying Hens with Naturally Acquired Salmonella-Enteritidis Phage Type-4 Infection. Vet Rec. 1993;133(16):391-3.

Hughes B, Duncan I. Influence of Strain and Environmental Factors Upon Feather Pecking and Cannibalism in Fowls. Br Poult Sci. 1972;13(6):525-8.

Humphrey T, Lanning D. The Vertical Transmission of Salmonellas and Formic-Acid Treatment of Chicken Feed - A Possible Strategy for Control. Epidemiol Infect. 1988;100(1):43-9.

Humphrey TJ, Chart H, Baskerville A, Rowe B. The Influence of Age on the Response of Spf Hens to Infection with *Salmonella* Enteritidis Pt4. Epidemiol Infect. 1991;106(1):33-43.

Humphrey T. Public health aspects of *Salmonella enterica* in food production. In: Mastroeni P, Maskell D, (Hrsg.). Salmonella infections: Clinical, Immunological and Molecular aspects. Cambridge: Cambridge University Press; 2005: 89-116.

Humphrey T. Are happy chickens safer chickens? Poultry welfare and disease susceptibility. Br Poult Sci. 2006;47(4):379-91.

Huneau-Salaün A, Chemaly M, Le Bouquin S, Lalande F, Petetin I, Rouxel S et al. Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* contamination in 519 French laying hen flocks at the end of the laying period. Prev Vet Med. 2009;89(1-2):51-8.

Husband A, Bryden W. Nutrition, stress and immune activation. Proceedings of the Nutrition Society of Australia. 1996;20:60-70.

Jantsch J, Chikkaballi D, Hensel M. Cellular aspects of immunity to intracellular *Salmonella enterica*. Immunol Rev. 2011;240(1):185-95.

Juul-Madsen H, Viertlboeck B, Smith A, Göbel T. Avian Innate Immune Response. In: Davison F, Kaspers B, Schat K, (Hrsg.). Avian Immunol. London: Elsevier. 2008;129-151.

Kaiser P, Stäheli P. Avian cytokines and chemokines. In: Davison F, Kaspers B, Schat K, (Hrsg.). Avian Immunol. London: Elsevier; 2008: 203-207.

Kaspers B, Gangl A, Gebauer A. Untersuchung zur zellvermittelten Immunantwort bei der Salmonelleninfektion des Haushuhnes. Bundesgesundheitsbl -Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz; 2000.

Keller L, Benson C, Krotec K, Eckroade R. Salmonella Enteritidis Colonization of the Reproductive-Tract and Forming and Freshly Laid Eggs of Chickens. Infect Immun. 1995;63(7):2443-9.

Keller L, Schifferli D, Benson C, Aslam S, Eckroade R. Invasion of chicken reproductive tissues and forming eggs is not unique to *Salmonella* Enteritidis. Avian Dis. 1997;41(3):535-9.

Kimura A, Reddy V, Marcus R, Cieslak P, Mohle-Boetani J, Kassenborg H et al. Chicken Consumption Is a Newly Identified Risk Factor for Sporadic *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis Infections in the United States: A Case-Control Study in FoodNet Sites. Clin Infect Dis. 2004;38(S3):S244-S252.

Kinde H, Shivaprasad H, Daft B, Read D, Ardans A, Breitmeyer R et al. Pathologic and bacteriologic findings in 27-week-old commercial laying hens experimentally infected with *Salmonella* Enteritidis, phage type 4. *Avian Dis.* 2000;44(2):239-48.

Kittagawa H, Shirashi S, Imagawa T, Uehara M. Ultrastructural characteristics and lectin-binding properties of M cells in the follicle-associated epithelium of chicken caecal tonsils. *J Anat.* 2000;197(4):607-16.

Klitgaard K, Friis C, Angen O, Boye M. Comparative profiling of the transcriptional response to iron restriction in six serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with different virulence potential. *BMC Genomics.* 2010.

Knodler L, Finlay B. *Salmonella* and apoptosis: to live or let die? *Microbes Infect.* 2011;3(14-15):1321-6.

Kogut M, Mcgruder E, Hargis B, Corrier D, Deloach J. Dynamics of Avian Inflammatory Response to *Salmonella*-Immune Lymphokines - Changes in Avian Blood Leukocyte Populations. *Inflammation.* 1994;18(4):373-88.

Kogut M. Dynamics of a protective avian inflammatory response: the role of an IL-8-like cytokine in the recruitment of heterophils to the site of organ invasion by *Salmonella* Enteritidis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2002a; 25(3):159-72.

Kogut M, Rothwell L, Kaiser P. Differential effects of age on chicken heterophil functional activation by recombinant chicken interleukin-2. *Dev Comp Immunol.* 2002b;26(9):817-30.

Kogut M, Rothwell L, Kaiser P. Priming by recombinant chicken interleukin-2 induces selective expression of IL-8 and IL-18 mRNA in chicken heterophils during receptor-mediated phagocytosis of opsonized and nonopsonized *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Mol Immunol.* 2003;40(9):603-10.

Kogut M, He H, Genovese K, Jiang Y. Feeding the BT cationic peptides to chickens at hatch reduces cecal colonization by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and primes innate immune cell functional activity. *Foodborne Pathog Dis.* 2010;7(1):32-0.

Kogut M, Tellez G, Hargis B, Corrier D, Deloach J. The Effect of 5-Fluorouracil Treatment of Chicks - A Cell Depletion Model for the Study of Avian Polymorphonuclear Leukocytes and Natural Host Defenses. *Poult Sci.* 1993;72(10):1873-80.

Korsgaard H, Madsen M, Feld NC, Mygind J, Hald T. The effects, costs and benefits of *Salmonella* control in the Danish table-egg sector. *Epidemiol Infect.* 2009;137(6):828-36.

Kramer J, Visscher A, Wagenaar J, Boonstra-Blom A, Jeurissen S. Characterization of the innate and adaptive immunity to *Salmonella* Enteritidis PT1 infection in four broiler lines. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001;79(3-4):219-33.

Ladisch S, Schroth S. Wetterstation Neukirchen/Whhra. Monatszusammenfassung Jahr 2010; 2011 (zitiert vom 29.11.2011). <<http://www.wetterstationneukirchenwyhra.de/content/bericht.php?id=jahr2010&PHPSESSID=po1ik3sf49c9k770mkuofp0h1>>.

Lai C, Chan R, Cheng A, Sung J, Leung J. Common Bile-Duct Stones - A Cause of Chronic Salmonellosis. *Am J Gastroenterol.* 1992;87(9):1198-9.

Lee C, Silva M, Siber A, Kelly A, Galyov E, McCormick B. A secreted *Salmonella* protein induces a proinflammatory response in epithelial cells, which promotes neutrophil migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(22):12283-8.

Lee G, Jackson G, Cooper G. Infection and immune responses in chickens exposed to *Salmonella* Typhimurium. *Avian Dis.* 1983;27(3):577-83.

Li S, Zhang M, Yan L, Lillehoj H, Pace L, Zhang S. Induction of CXC Chemokine Messenger-RNA Expression in Chicken Oviduct Epithelial Cells by *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis via the Type Three Secretion System-1. *Avian Dis.* 2009;53(3):396-404.

Liebana E, Garcia-Migura L, Clouting C, Clifton-Hadley FA, Breslin M, Davies RH. Molecular fingerprinting evidence of the contribution of wildlife vectors in the maintenance of *Salmonella* Enteritidis infection in layer farms. *J Appl Microbiol.* 2003;94(6):1024-9.

Lillehoj H, Chung K. Postnatal-Development of Lymphocyte-T Subpopulations in the Intestinal Intraepithelium and *Lamina Propria* in Chickens. *Vet Immunol Immunopathol.* 1992;31(3-4):347-60.

Lillehoj E, Yun C, Lillehoj H. Vaccines against the avian enteropathogens *Eimeria*, *Cryptosporidium* and *Salmonella*. *Anim Health Res Rev.* 2000;1(1):47-65.

Linde K, Fthenakis GC, Fichtner A. Bacterial live vaccines with graded level of attenuation achieved by antibiotic resistance mutations: transduction experiments on the functional unit of resistance, attenuation and further accompanying markers. *Veterinary Microbiology.* 1998;62(2):121-34.

Lister S. *Salmonella*-Enteritidis Infection in Broilers and Broiler Breeders. *Vet Rec.* 1988;123(13):350.

Liu W, Yang Y, Chung N, Kwang J. Induction of humoral immune response and protective immunity in chickens against *Salmonella enteritidis* after a single dose of killed bacterium-loaded microspheres. *Avian Dis.* 2001;45(4):797-806.

Lowenthal J, Connick T, Mcwaters P, York J. Development of T-Cell Immune Responsiveness in the Chicken. *Immunol Cell Biol.* 1994;72(2):115-22.

Lu S, Killoran P, Riley L. Association of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis YafD with resistance to chicken egg albumen. *Infect Immun.* 2003;71(12):6734-41.

Mack D, Michail S, Wei S, McDougall L, Hollingsworth M. Probiotics inhibit enteropathogenic *E.coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am J Physiol Gastrointest Liv Physiol.* 1999;276(4):G941-G950.

Marcus R, Rabatsky-Ehr T, Mohle-Boetani J, Farley M, Medus C, Shiferaw B et al. Dramatic decrease in the incidence of *Salmonella* serotype Enteritidis infections in 5 FoodNet sites: 1996-1999. *Clin Infect Dis.* 2004;38:S135-S141.

Mastroeni P, Simmons C, Fowler R, Hormaeche C, Dougan G. Igh-6(-/-) (B-cell-deficient) mice fail to mount solid acquired resistance to oral challenge with virulent *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and show impaired Th1 T-cell responses to *Salmonella* antigens. *Infect Immun.* 2000;68(1):46-53.

McSorley S, Cookson B, Jenkins M. Characterization of CD4(+) T cell responses during natural infection with *Salmonella* Typhimurium. *J Immunol.* 2000;164(2):986-93.

Mead G, Barrow P. *Salmonella* Control in Poultry by Competitive-Exclusion Or Immunization. *Letters Appl Microbiol.* 1990;10(6):221-7.

Meenakshi M, Bakshi C, Butchaiah G, Bansal M, Siddiqui M, Singh V. Adjuvanted outer membrane protein vaccine protects poultry against infection with *Salmonella* Enteritidis. Vet Res Commun. 1999;23(2):81-90.

Messens W, Grijspeerdt K, Herman L. Eggshell characteristics and penetration by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis through the production period of a layer flock. Br Poult Sci. 2005;46(6):694-700.

Messens W, Grijspeerdt K, Herman L. Eggshell penetration of hen's eggs by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis upon various storage conditions. Br Poult Sci. 2006;47(5):554-60.

Methner U, Alshabibi S, Meyer H. Experimental Oral Infection of Specific Pathogen-Free Laying Hens and Cocks with *Salmonella* Enteritidis Strains. J Vet Med Dis Vet Pub Health. 1995a;42(8):459-69.

Methner U, Koch H, Meyer H. Model for Testing Efficacy of Control Measures Against *Salmonella* Infections in Poultry. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 1995b;102(6):225-8.

Methner U, Barrow P, Martin G, Meyer H. Comparative study of the protective effect against *Salmonella* colonisation in newly hatched SPF chickens using live, attenuated *Salmonella* vaccine strains, wild-type *Salmonella* strains or a competitive exclusion product. Int J Food Microbiol. 1997a;35(3):223-30.

Methner U, Steinbach G. Efficacy of maternal *Salmonella* antibodies against oral infection of chicks with *Salmonella* Enteritidis. Berl Munch Tierarztl Wochenschrift. 1997b;110(10):373-7.

Methner U, Barrow P, Berndt A, Steinbach G. Combination of vaccination and competitive exclusion to prevent *Salmonella* colonization in chickens: experimental studies. Int J Food Microbiol. 1999;49(1-2):35-42.

Methner U, Berndt A.. Untersuchung zur T-Zell-Immunantwort von Hühnerküken nach oraler Applikation von Salmonellen-Impf- und Wildstämmen. Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz, editor; 2000.

Methner U. „Competitive Exclusion“ - ein Verfahren zur Prophylaxe der *Salmonella*-Infektion beim Geflügel. Lohmann Information 2 [1617-2892]. 2001.

Methner U, Keiling S, Kreutzer B, Schweinitz P. Impact of maternal antibodies on the efficacy of immunisation of chicks with live *Salmonella* vaccines. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 2002;109(4):149-53.

Methner U, Diller R, Reiche R, Bohland K. Occurrence of *salmonella* in laying hens in different housing systems and conclusion for the control. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2006;119(11-12):467-73.

Methner U. Vaccination of poultry against *Salmonella*: what is the ideal vaccine (strain)?; 2007 (zitiert vom 01.01.2011). <[http://www.cabi.org/animalscience/Uploads/File/AnimalScience/additionalFiles/WPSA2007/8\\_Methner%20Ulrich.pdf](http://www.cabi.org/animalscience/Uploads/File/AnimalScience/additionalFiles/WPSA2007/8_Methner%20Ulrich.pdf)>.

Meyer H, Koch H, Methner U, Steinbach G. Vaccines in Salmonellosis Control in Animals. J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis. 1993;278(2-3):407-15.

Miyamoto T, Baba E, Tanaka T, Sasai K, Fukata T, Arakawa A. *Salmonella* Enteritidis contamination of eggs from hens inoculated by vaginal, cloacal, and intravenous routes. Avian Dis. 1997;41(2):296-303.

- Miyamoto T, Kitaoka D, Withanage G, Fukata T, Sasai K, Baba E. Evaluation of the efficacy of *Salmonella* Enteritidis oil-emulsion bacterin in an intravaginal challenge model in hens. *Avian Dis.* 1999;43(3):497-505.
- Mizumoto N, Sasai K, Tani H, Baba E. Specific adhesion and invasion of *Salmonella* Enteritidis in the vagina of laying hens. *Vet Microbiol.* 2005;111(1-2):99-105.
- Moro V, Chauve C, Zenner L. Experimental infection of *Salmonella* Enteritidis by the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Vet Parasitol.* 2007;146(3-4):329-6.
- Muir W, Bryden W, Husband A. Immunity, vaccination and the avian intestinal tract. *Dev Comp Immunol.* 2000;24(2-3):325-42.
- Mulder R. Impact of Transport and Related Stresses on the Incidence and Extent of Human Pathogens in Pigmeat and Poultry. *J Food Safety.* 1995;15(3):239-46.
- Mumma G, Griffin P, Meltzer M, Braden C, Tauxe R. Egg quality assurance programs and egg-associated *Salmonella* Enteritidis infections, United States. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(10):1782-9.
- Nagaraja K, Rajashekara G. Vaccination against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection: dilemma and realities. In: Saeed A, (Hrsg.). *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in humans and animals. Iowa State University Press, Ames, USA; 1999: 397-404.
- Nakamura M, Nagamine N, Takahashi T, Suzuki S, Sato S. Evaluation of the efficacy of a bacterin against *Salmonella* Enteritidis infection and the effect of stress after vaccination. *Avian Dis.* 1994;38(4):717-24.
- Nandre RM, Chaudhari AA, Matsuda K, Hwa Lee J. Immunogenicity of a *Salmonella* Enteritidis mutant as vaccine candidate and its protective efficacy against salmonellosis in chickens. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011;144(3-4):299-311.
- Nassar T, Alnakhli H, Alogaily Z. Use of Live and Inactivated *Salmonella* Enteritidis Phage Type-4 Vaccines to Immunize Laying Hens Against Experimental-Infection. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties.* 1994;13(3):855-67.
- Nicol C, Lindberg A, Phillips A, Pope S, Wilkins L, Green L. Influence of prior exposure to wood shavings on feather pecking, dustbathing and foraging in adult laying hens. *Appl Anim Behav Sci.* 2001;73(2):141-55.
- Nnalue N, Shnyra A, Hultenby K, Lindberg A. *Salmonella* Choleraesuis and *Salmonella* Typhimurium Associated with Liver-Cells After Intravenous Inoculation of Rats Are Localized Mainly in Kupffer Cells and Multiply Intracellularly. *Infect Immun.* 1992;60(7):2758-68.
- Nurmi E, Rantala M. New Aspects of *Salmonella* Infection in Broiler Production. *Nature.* 1973;241(5386):210-1.
- O'Brien S, Gillespie I, Charlett A, Adak B, Threlfall J, Ward L. National case-control study of *Salmonella* Enteritidis phage type 14b infection in England and Wales implicates eggs used in catering trade. *Eurosurveillance Weekly.* 2004;8(8).
- Okamura M, Kamijima Y, Miyamoto T, Tani H, Sasai K, Baba E. Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. *Avian Dis.* 2001;45(1):61-9.

- Okamura M, Lillehoj HS, Raybourne RB, Babu U, Heckert R. Antigen-specific lymphocyte proliferation and interleukin production in chickens immunized with killed *Salmonella* Enteritidis vaccine or experimental subunit vaccines. *Avian Dis.* 2003;47(4):1331-8.
- Okamura M, Lillehoj HS, Raybourne RB, Babu US, Heckert RA. Cell-mediated immune responses to a killed *Salmonella* Enteritidis vaccine: lymphocyte proliferation, T-cell changes and interleukin-6 (IL-6), IL-1, IL-2, and IFN-gamma production. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004;27(4):255-72.
- Okamura M, Tachizaki H, Kubo T, Kikuchi S, Suzuki A, Takehara K et al. Comparative evaluation of a bivalent killed *Salmonella* vaccine to prevent egg contamination with *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Typhimurium, and Gallinarum biovar Pullorum, using 4 different challenge models. *Vaccine.* 2007;25(25):4837-44.
- Padron M. *Salmonella* Typhimurium Penetration Through the Eggshell of Hatching Eggs. *Avian Dis.* 1990;34(2):463-5.
- Papezova K, Gregorova D, Jonuschies J, Rychlik I. Ordered expression of virulence genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Folia Microbiologica.* 2007;52(2):107-14.
- Paramithiotis E, Ratcliffe MJH. Bursa-Dependent Subpopulations of Peripheral Lymphocytes-B in Chicken Blood. *Eur J Immunol.* 1993;23(1):96-102.
- Parker C, Asokan K, Guard-Petter J. Egg contamination by *Salmonella* serovar Enteritidis following vaccination with Delta-*aroA* *Salmonella* serovar Typhimurium. *FEMS Microbiol Letters.* 2001;195(1):73-8.
- Penha F, Rafael A, DePaiva J, DaSilva M, DeAlmeida A, Berchieri Junior A. Control of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum in birds by using live vaccine candidate containing attenuated *Salmonella* Gallinarum mutant strain. *Vaccine.* 2010;28(16):2853-9.
- Phalipon A, Sansonetti P. Microbial-host interactions at mucosal sites. Host response to pathogenic bacteria at mucosal sites. *Defense of Mucosal Surfaces: Pathogenesis, Immunity and Vaccines.* 1999;236:163-89.
- Piao Z, Toyota-Hanatani Y, Ohta H, Sasai K, Tani H, Baba E. Effects of *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Enteritidis vaccination in layer hens subjected to *S. Enteritidis* challenge and various feed withdrawal regimens. *Vet Microbiol.* 2007;125(1-2):111-9.
- Popoff M, Le Minor L. Genus XXXIII. *Salmonella* Lignières 1900, 398. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, (Hrsg.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Springer; 2005: 764-799.
- Poppe C, Demczuk W, Mcfadden K, Johnson R. Virulence of *Salmonella* Enteritidis Phagetype-4, Phagetype-8 and Phagetype-13 and Other *Salmonella spp* for Day-Old Chicks, Hens and Mice. *Canad J Vet Res.* 1993;57(4):281-7.
- Pötzsch C, Lewis K, Nicol C, Green L. A cross-sectional study of the prevalence of vent pecking in laying hens in alternative systems and its associations with feather pecking, management and disease. *Appl Anim Behav Sci.* 2001;74(4):259-72.
- Proplanta®. 4,15 Millionen Legehennenplätze in Sachsen; 2009 (zitiert vom 11.11.2011). <[http://www.proplanta.de/Agrar-Nachrichten/Agrarwirtschaft/4-15-Millionen-Legehennenplaetze-in-Sachsen\\_article1236245022.html](http://www.proplanta.de/Agrar-Nachrichten/Agrarwirtschaft/4-15-Millionen-Legehennenplaetze-in-Sachsen_article1236245022.html)>
- Rabsch, W. Die Salmonellose im ausgehenden 20. Jahrhundert.: Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz, 2000.

Rabsch W, Liesegang A, Tschape H. Lab-based surveillance of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis live vaccines in humans in Germany. Berl Munch Tierarztl Wochenschrift. 2001;114(11-12):433-7.

Rabsch W, Prager R, Braun P, Methner U. *Salmonella* in poultry flocks and humans--*S. enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis in the past. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2007;120(7-8):328-33.

Rees J, Pannier M, McNees A, Shallow S, Angulo F, Vugia D. Persistent Diarrhea, Arthritis, and Other Complications of Enteric Infections: A Pilot Survey Based on California FoodNet Surveillance, 1998-1999. Clin Infect Dis. 2004;38(S3):S311-S317.

Robert-Koch-Institut (RKI). survstat@RKI; 2010 (zitiert vom 15.12.2010). <<http://www3.rki.de/SurvStat/>>

Rodenburg T, Tuytens F, Sonck B, De Reu K, Herman L, Zoons J. Welfare, Health, and Hygiene of Laying Hens Housed in Furnished Cages and in Alternative Housing Systems. J Appl Anim Welfare Sci. 2005;8(3):211-26.

Rodrigue D, Tauxe R, Rowe B. International Increase in *Salmonella* Enteritidis - A New Pandemic. Epidemiol Infect. 1990;105(1):21-7.

Roland K, Curtiss R, Sizemore D. Construction and evaluation of a Delta cya Delta crp *Salmonella* Typhimurium strain expressing avian pathogenic Escherichia coli O78 LPS as a vaccine to prevent airsacculitis in chickens. Avian Dis. 1999;43(3):429-41.

Schneitz C, Mead G. Competitive Exclusion in *Salmonella* in Domestic animals. In: Wray C, Wray A, (Hrsg.). *Salmonella* in Domestic Animals. New York: CABI publishing; 2002: 301-322.

Schuetze N, Schoeneberger S, Mueller U, Freudenberg M, Alber G, Straubinger R. IL-12 family members: differential kinetics of their TLR4-mediated induction by *Salmonella* Enteritidis and the impact of IL-10 in bone marrow-derived macrophages. Int Immunol. 2005;17(5):649-59.

Schwaiger K, Schmied E, Bauer J. Comparative analysis of antibiotic resistance characteristics of Gram-negative bacteria isolated from laying hens and eggs in conventional and organic keeping systems in Bavaria, Germany. Zoonoses Pub Health. 2008;55(7):331-41.

Seo K, Holt P, Gast T, Hofacre C. Elimination of early *Salmonella* Enteritidis infection after treatment with competitive-exclusion culture and enrofloxacin in experimentally infected chicks. Poult Sci. 2000;79(10):1408-13.

Shelobolina E, Sullivan S, O'Neill K, Nevin K, Lovley D. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from Low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp nov. Appl Environ Microbiol. 2004;70(5):2959-65.

Silva E, Snoeyenbos G, Weinack O, Smyser C. Studies on the Use of 9R Strain of *Salmonella* Gallinarum As A Vaccine in Chickens. Avian Dis. 1981;25(1):38-52.

Slauch J. How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. Mol Microbiol. 2011.

Smith A, Beal R. The Avian Enteric Immune System in Health and Disease. In: Davison F, Kaspers B, Schat K, (Hrsg.). Avian Immunol. London: Elsevier; 2008: 243-261.



- Snoeyenbos G, Weinack O, Smyser C. Further-Studies on Competitive Exclusion for Controlling *Salmonella* in Chickens. J Am Vet Med Assoc. 1978;173(7):891-2.
- Sobel J, Hirshfeld AB, McTigue K, Burnett CL, Altekruze S, Brenner F et al. The pandemic of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 reaches Utah: a complex investigation confirms the need for continuing rigorous control measures. Epidemiol Infect. 2000;125(1):1-8.
- Spreng S, Dietrich G, Weidinger G. Rational design of *Salmonella*-based vaccination strategies. Methods. 2006;38(2):133-43.
- Springer S, Lehmann J, Lindner T, Thielebein J, Alber C, Selbitz H. A new live *Salmonella* Enteritidis vaccine for chicken - experimental evidence of its safety and efficacy. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2000;113(6):246-52.
- Springer S, Lindner T, Ahrens M, Weitow G, Prandini F, Selbitz H. Duration of immunity induced in chickens by an attenuated live *Salmonella* Enteritidis vaccine and an inactivated *Salmonella* enteritidis/typhimurium vaccine. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2011;124:10-4.
- Stabler J, McCormick T, Powell K, Kogut M. Avian Heterophils and Monocytes - Phagocytic and Bactericidal Activities Against *Salmonella* Enteritidis. Vet Microbiol. 1994;38(4):293-305.
- Stavric S, Gleeson TM, Buchanan B, Blanchfield B. Experience of the Use of Probiotics for *Salmonella* Control in Poultry. Letters Appl Microbiol. 1992;14(3):69-71.
- Suzuki S. Pathogenicity of *Salmonella* Enteritidis in Poultry. Int J Food Microbiol. 1994;21(1-2):89-105.
- Swaggerty C, Pevzner I, Lowry V, Farnell M, Kogut M. Functional comparison of heterophils isolated from commercial broiler chickens. Avian Pathol. 2003;32(1):95-102.
- Swaggerty CL, Kogut MH, Ferro PJ, Rothwell L, Pevzner IY, Kaiser P. Differential cytokine mRNA expression in heterophils isolated from *Salmonella*-resistant and -susceptible chickens. Immunol. 2004;113(1):139-48.
- Takehara K, Kobayashi K, Ruttanapumma R, Kamikawa M, Nagata T, Yokomizo Y et al. Adjuvant effect of chicken interferon-gamma for inactivated *Salmonella* Enteritidis antigen. J Vet Med Sci. 2003;65(12):1337-41.
- Thiagarajan D, Saeed A, Asem E. Mechanism of Transovarian Transmission of *Salmonella* Enteritidis in Laying Hens. Poult Sci. 1994;73(1):89-98.
- Thiagarajan D, Saeed M, Turek J, Asem E. In vitro attachment and invasion of chicken ovarian granulosa cells by *Salmonella* Enteritidis phage type 8. Infect immun. 1996;64(12):5015-21.
- Thomas M, Klinkenberg D, Ejeta G, Van Knapen F, Bergwerff A, Stegeman J et al. Quantification of Horizontal Transmission of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Bacteria in Pair-Housed Groups of Laying Hens. Appl Environ Microbiol. 2009;75(19):6361-6.
- Thomson N, Clayton D, Windhorst D, Davidson S, Churcher C, Quail M et al. Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. Genome Res. 2008;18(10):1624-37.
- Thorns CJ. Bacterial food-borne zoonoses. Rev Sci Tech. 2000;19(1):226-39.

Tierseuchenkasse Sachsen (TSK Sachsen). Programm der Sächsischen Tierseuchenkasse zur Bekämpfung von *Salmonella Gallinarum Pullorum* in Rassegeflügelbeständen im Freistaat Sachsen; 1995 (zitiert vom 18.12.2010). <<http://www.tsk-sachsen.de/index.php/gefluegelgesundheit/leistungen-und-programme/129-bekaempfung-von-salmonella-gallinarum-pullorum->>.

Turcotte C, Woodward MJ. Cloning, Dna Nucleotide-Sequence and Distribution of the Gene Encoding the Sef14 Fimbrial Antigen of *Salmonella* Enteritidis. J Gen Microbiol. 1993;139:1477-85.

Vadehra D, Baker R, Naylor H. Salmonella Infection of Cracked Eggs. Poult Sci. 1969;48(3):954-&.

Van de Giessen A, Ament A, Notermans S. Intervention Strategies for *Salmonella* Enteritidis in Poultry Flocks - A Basic Approach. Int J Food Microbiol. 1994; 21(1-2):145-54.

Van Hemert S, Hoekman A, Smits M, Rebel J. Gene expression responses to a *Salmonella* infection in the chicken intestine differ between lines. Vet Immunol Immunopathol. 2006;114(3-4):247-58.

Van Hoorebeke S, Van Immerseel F, Schulz J, Hartung J, Harisberger M, Barco L et al. Determination of the within and between flock prevalence and identification of risk factors for *Salmonella* infections in laying hen flocks housed in conventional and alternative systems. Prev Vet Med. 2010;94(1-2):94-100.

Van Immerseel F. Stress-induced survival strategies enable *Salmonella* Enteritidis to persistently colonize the chicken oviduct tissue and cope with antimicrobial factors in egg white: A hypothesis to explain a pandemic. Gut Pathog. 2010;2(1):23.

Van Immerseel F, Cauwerts K, Devriese L, Haesebrouck F, Ducatelle R. Feed additives to control *Salmonella* in poultry. World's Poult Sci J. 2002a;58:501-13.

Van Immerseel F, De Buck J, De Smet I, Mast J, Haesebrouck F, Ducatelle R. Dynamics of immune cell infiltration in the caecal lamina propria of chickens after neonatal infection with a *Salmonella* Enteritidis strain. Dev Comp Immunol. 2002b;26(4):355-64.

Van Immerseel F, De Buck J, De Smet I, Mast J, Haesebrouck F, Ducatelle R. The effect of vaccination with a *Salmonella* Enteritidis *aroA* mutant on early cellular responses in caecal lamina propria of newly-hatched chickens. Vaccine. 2002c;20(23-24):3034-41.

Van Immerseel F, De Buck J, Pasmans F, Bohez L, Boyen F, Haesebrouck F et al. Intermittent long-term shedding and induction of carrier birds after infection of chickens early posthatch with a low or high dose of *Salmonella* Enteritidis. Poult Sci. 2004;83(11):1911-6.

Van Immerseel F, Methner U, Rychlik I, Nagy B, Velge P, Martin G et al. Vaccination and early protection against non-host-specific *Salmonella* serotypes in poultry: exploitation of innate immunity and microbial activity. Epidemiol Infect. 2005;133(6):959-78.

Vandaveer S, Erf G, Durdik J. Avian T helper one/two immune response balance can be shifted toward inflammation by antigen delivery to scavenger receptors. Poult Sci. 2001;80(2):172-81.

Wales A, Breslin M, Carter B, Sayers R, Davies R. A longitudinal study of environmental *Salmonella* contamination in caged and free-range layer flocks. Avian Pathol. 2007;36(3):187-97.

Wales AD, Carrique-Mas JJ, Rankin M, Bell B, Thind BB, Davies RH. Review of the Carriage of Zoonotic Bacteria by Arthropods, with Special Reference to *Salmonella* in Mites, Flies and Litter Beetles. Zoonoses Pub Health. 2010;57(5):299-314.

Wallis T. Host-specificity of *Salmonella* infections in an animal species. In: Mastroeni P, Maskell D, (Hrsg.). *Salmonella* Infections: Clinical, Immunological and Molecular Aspects. Cambridge: Cambridge University Press; 2005: 57-88.

Ward L, Threlfall J, Smith H, O'Brian S, Riemann H, Kass P et al. *Salmonella* Enteritidis Epidemic Sci. 2000;287(5459):1753c.

Watson PR, Galyov EE, Paulin SM, Jones PW, Wallis TS. Mutation of invH, but Not stn, Reduces *Salmonella*-Induced Enteritis in Cattle. Infect immun. 1998;66(4):1432-8.

Wegener H, Hald T, Wong D, Madsen M, Korsgaard H, Bager F et al. *Salmonella* control programs in Denmark. Emerg Infect Dis. 2003;9(7):774-80.

Weltgesundheitsorganisation (WHO). Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe, 7th Report 1993-1998. Tirado C, Schmidt K, (Hrsg.). 2000.

Wigley P. Genetic resistance to *Salmonella* infection in domestic animals. Res Vet Sci. 2004;76(3):165-9.

Wigley P, Hulme S, Powers C, Beal R, Berchieri A, Smith A et al. Infection of the reproductive tract and eggs with *Salmonella enterica* serovar Pullorum in the chicken is associated with suppression of cellular immunity at sexual maturity. Infect immun. 2005;73(5):2986-90.

Withanage G, Wigley P, Kaiser P, Mastroeni P, Brooks H, Powers C et al. Cytokine and Chemokine Responses Associated with Clearance of a Primary *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Infection in the Chicken and in Protective Immunity to Rechallenge. Infect immun. 2005;73(8):5173-82.

Woodward M, Gettinby G, Breslin M, Corkish J, Houghton S. The efficacy of Salenvac, a *Salmonella enterica* subsp *enterica* serotype Enteritidis iron-restricted bacterin vaccine, in laying chickens. Avian Pathol. 2002;31(4):383-92.

Zentralverband der deutschen Geflügelwirtschaft e.V. (ZDG). Leitfaden Salmonellenbekämpfung bei Legehennen . 2007.

Zhang-Barber L, Turner AK, Barrow PA. Vaccination for control of *Salmonella* in poultry. Vaccine. 1999;17(20-21):2538-45.

## 9 ANHANG

### Zusammensetzung und Herstellung bestimmter verwendeter Medien

#### Nalidixinsäure-Stammlösung 5 %ig

Tab. 10 **Zusammensetzung** der Nalidixinsäure-Stammlösung 5%ig

Verwendete Zutat (Hersteller):	Artikelnummer:	Mengenangabe:
Nalidixinsäure-Granulat (Fluka Biochemika)	70126	5 g
Natronlauge, c(NaOH) 1 mol/l		10 ml
Aqua bidest., steril		ad 100 ml

**Herstellung:** Nalidixinsäure einwiegen, Natronlauge hinzupipettieren und Nalidixinsäure darin lösen. Aqua bidest. hinzugeben; gut mischen. In 2 ml-Eppendorfgefäße abfüllen und bei -18 °C aufbewahren.

#### Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS-Lösung)

Tab. 11 **Zusammensetzung** der Phosphat-gepufferten Kochsalzlösung (PBS-Lösung)

Verwendete Zutat (Hersteller):	Artikelnummer:	Mengenangabe
Natriumchlorid (Roth GmbH + Co KG)	3957.1	80 g
di-Natriumhydrogenphosphat (AppliChem, Darmstadt)	1372,1000	14,4 g
Kaliumdihydrogenphosphat (Roth GmbH + Co KG)	PO 18.2	2,4 g
Kaliumchlorid (MERCK, Darmstadt)	104936.0500	2 g
Aqua bidest.		Ad 1 Liter

**Herstellung:** Diese Stammlösung 1:10 verdünnt mit Aqua bidest. ergibt die Gebrauchslösung, pH-Wert wird auf 7,2-7,4 eingestellt. Autoklavieren.

## Inhaltsstoffe und Zusammensetzung des Futters

### Alleinfuttermittel für Legehennen (Deuka all-mash L Mehl, Deuka)

Tab. 12 **Inhaltsstoffe (laut Hersteller):**

Inhaltsstoffe:	Prozentualer Anteil:
Rohprotein	16,5 %
Calcium	3,6 %
Phosphor	0,5 %
Natrium	0,15 %
Methionin	0,35 %
Rohfett	3,7 %
Rohfaser	3,5 %
Rohasche	12,5 %

Tab. 13 **Zusatzstoffe je kg Mischfutter:**

Zusatzstoffe:	Mengenangabe:
Vitamin A	12.000 I.E.
Vitamin D 3	2.500 I.E.
Vitamin E (DL- $\alpha$ -Tocopherolacetat)	20 mg
6-Phytase (EC 3.1.3.26) (E 1614 (i))	500 FYT
Endo-1 4- $\beta$ -Xylanase EC 3.2.18 (EG Nr.51)	10 IU
Kupfer-II-Sulfat, Pentahydrat E4	8 mg
DL-Methionin	
Lutein/Zeaxanthin	
Canthaxanthin	
Metabolisierbare Energie (ME)	11 MJ/kg
Antioxidans: Propylgallat, BHT, Zitronensäure	

Tab. 14 **Zusammensetzung:**

Inhaltsstoffe:	Prozentualer Anteil:
Mais	35,5 %
Weizen	25,6 %
Sojaextraktionsschrot, dampferhitzt	19,3 %
Calciumcarbonat	9,4 %
Weizengrießkleie	8,0 %
Pflanzenöl (Soja, Raps, Sonnenblumen, Palm)	1,0 %
Monocalciumphosphat (anorganisch)	0,4 %
Natriumchlorid	0,25 %

## Befunde der Organe

### Gruppe A

#### Versuchszeitpunkt 39. LW

Tab. 15 Sektion 1 (17.06.2010, zwei Tage *post infectionem* (*p.inf.*)): Organbesiedelung (qualitativ und quantitativ) mit *S. Enteritidis*; Keimzahlen in Koloniebildende Einheiten/ Gramm (KbE/g) und qualitativer Nachweis mit 0= negativ und 1= positiv

	Caecumwand		Caecuminhalt		Leber		Ovar		Ovidukt	
	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ
Tier 61	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Tier 62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 16 Sektion 2 (22.06.2010, sieben Tage *p.inf.*): Organbesiedelung (qualitativ und quantitativ) mit *S. Enteritidis*; Keimzahlen in KbE/g und qualitativer Nachweis mit 0= negativ und 1= positiv

	Caecumwand		Caecuminhalt		Leber		Ovar		Ovidukt	
	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ
Tier 91	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Tier 92	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 93	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Tier 94	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 95	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

#### Versuchszeitpunkt 54. LW

Tab. 17 Sektion 1 (09.09.2010, zwei Tage *p.inf.*): Organbesiedelung (qualitativ und quantitativ) mit *S. Enteritidis*; Keimzahlen in KbE/g und qualitativer Nachweis mit 0= negativ und 1= positiv

	Caecumwand		Caecuminhalt		Leber		Ovar		Ovidukt	
	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ
Tier 85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 86	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Tier 87	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 18 Sektion 2 (14.09.2010, sieben Tage *p.inf.*): Organbesiedelung (qualitativ und quantitativ) mit *S. Enteritidis*; Keimzahlen in KbE/g und qualitativer Nachweis mit 0= negativ und 1= positiv

	Caecumwand		Caecuminhalt		Leber		Ovar		Ovidukt	
	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ
Tier 115	0	0	0	0	1	2,72 x10 <sup>1</sup>	0	0	0	0
Tier 116	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 117	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Tier 118	0	0	0	0	1	1,23 x10 <sup>2</sup>	0	0	0	0
Tier 119	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 120	0	0	0	0	1	9,46 x10 <sup>2</sup>	0	0	0	0

### Versuchszeitpunkt 69. LW

Tab. 19 Sektion 1 (14.01.2011, zwei Tage *p.inf.*): Organbesiedelung (qualitativ und quantitativ) mit *S. Enteritidis*; Keimzahlen in KbE/g und qualitativer Nachweis mit 0= negativ und 1= positiv

	Caecumwand		Caecuminhalt		Leber		Ovar		Ovidukt	
	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ
Tier 61	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 62	1	3,82 x10 <sup>3</sup>	1	1,8 x10 <sup>2</sup>	0	0	0	0	0	0
Tier 63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 64	1	4,00 x10 <sup>2</sup>	1	1,09 x10 <sup>3</sup>	1	2,73 x10 <sup>1</sup>	0	0	0	0
Tier 65	1	1,36 x10 <sup>2</sup>	1	9,00 x10 <sup>1</sup>	0	0	0	0	0	0
Tier 66	1	8,54 x10 <sup>2</sup>	1	1,12 x10 <sup>4</sup>	1	0	0	0	0	0

Tab. 20 Sektion 2 (19.01.2011, sieben Tage *p.inf.*): Organbesiedelung (qualitativ und quantitativ) mit *S. Enteritidis*; Keimzahlen in KbE/g und qualitativer Nachweis mit 0= negativ und 1= positiv

	Caecumwand		Caecuminhalt		Leber		Ovar		Ovidukt	
	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ
Tier 91	1	1,81 x10 <sup>1</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 92	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Tier 93	0	0	0	0	1	2,73 x10 <sup>1</sup>	0	0	0	0
Tier 94	0	0	0	0	1	2,73 x10 <sup>1</sup>	1	0	0	0
Tier 95	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Tier 96	0	0	0	0	1	2,18 x10 <sup>2</sup>	1	9,10 x10 <sup>1</sup>	0	0



**Gruppe B**

**Versuchszeitpunkt 39. LW**

Tab. 21 Sektion 1 (17.06.2010, zwei Tage *p.inf.*): Organbesiedelung (qualitativ und quantitativ) mit *S. Enteritidis*; Keimzahlen in KbE/g und qualitativer Nachweis mit 0= negativ und 1= positiv

	Caecumwand		Caecuminhalt		Leber		Ovar		Ovidukt	
	qualitativ	Quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ
Tier 67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 69	1	0	1	$1,81 \times 10^2$	0	0	0	0	0	0
Tier 70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 22 Sektion 2 (22.06.2010, sieben Tage *p.inf.*): Organbesiedelung (qualitativ und quantitativ) mit *S. Enteritidis*; Keimzahlen in KbE/g und qualitativer Nachweis mit 0= negativ und 1= positiv

	Caecumwand		Caecuminhalt		Leber		Ovar		Ovidukt	
	qualitativ	Quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ
Tier 97	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Tier 98	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Tier 99	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Tier 100	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Tier 101	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 102	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Versuchszeitpunkt 54. LW**

Tab. 23 Sektion 1 (09.09.2010, zwei Tage *p.inf.*): Organbesiedelung (qualitativ und quantitativ) mit *S. Enteritidis*; Keimzahlen in KbE/g und qualitativer Nachweis mit 0= negativ und 1= positiv

	Caecumwand		Caecuminhalt		Leber		Ovar		Ovidukt	
	qualitativ	Quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ
Tier 79	1	$1,27 \times 10^2$	1	$1,27 \times 10^4$	1	$9,00 \times 10^0$	0	0	0	0
Tier 80	1	$1,62 \times 10^3$	1	$3,18 \times 10^3$	0	0	0	0	0	0
Tier 81	1	$1,80 \times 10^2$	1	$9,00 \times 10^2$	0	0	0	0	0	0
Tier 82	1	$1,80 \times 10^3$	1	$8,10 \times 10^2$	1	$9,00 \times 10^0$	0	0	0	0
Tier 83	1	$1,80 \times 10^2$	1	$2,72 \times 10^2$	1	$7,20 \times 10^1$	0	0	0	0
Tier 84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 24 Sektion 2 (14.09.2010, sieben Tage *p.inf.*): Organbesiedelung (qualitativ und quantitativ) mit *S. Enteritidis*; Keimzahlen in KbE/g und qualitativer Nachweis mit 0= negativ und 1= positiv

	Caecumwand		Caecuminhalt		Leber		Ovar		Ovidukt	
	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ
Tier 109	1	$1,45 \times 10^2$	1	$7,27 \times 10^1$	0	0	0	0	0	0
Tier 110	1	$1,04 \times 10^3$	1	0	1	$1,80 \times 10^1$	0	0	0	0
Tier 111	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Tier 112	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 113	1	$1,63 \times 10^3$	1	$4,45 \times 10^3$	0	0	0	0	0	0
Tier 114	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0

### Versuchszeitpunkt 69. LW

Tab. 25 Sektion 1 (14.01.2011, zwei Tage *p.inf.*): Organbesiedelung (qualitativ und quantitativ) mit *S. Enteritidis*; Keimzahlen in KbE/g und qualitativer Nachweis mit 0= negativ und 1= positiv

	Caecumwand		Caecuminhalt		Leber		Ovar		Ovidukt	
	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ
Tier 67	1	$6,70 \times 10^2$	1	$6,36 \times 10^2$	1	$9,00 \times 10^0$	0	0	0	0
Tier 68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 69	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 70	0	0	1	$1,82 \times 10^2$	1	0	0	0	0	0
Tier 71	1	$5,45 \times 10^1$	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 72*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* ist während der Adaptionswoche verstorben, weshalb es nicht zur Sektion zur Verfügung stand

Tab. 26 Sektion 2 (19.01.2011, sieben Tage *p.inf.*): Organbesiedelung (qualitativ und quantitativ) mit *S. Enteritidis*; Keimzahlen in KbE/g und qualitativer Nachweis mit 0= negativ und 1= positiv

	Caecumwand		Caecuminhalt		Leber		Ovar		Ovidukt	
	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ
Tier 97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 98	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 101	0	0	0	0	0	0	0	0	1	$4,64 \times 10^2$
Tier 102	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

### Gruppe C

#### Versuchszeitpunkt 39. LW

Tab. 27 Sektion 1 (17.06.2010, zwei Tage *p.inf.*): Organbesiedelung (qualitativ und quantitativ) mit *S. Enteritidis*; Keimzahlen in KbE/g und qualitativer Nachweis mit 0= negativ und 1= positiv

	Caecumwand		Caecuminhalt		Leber		Ovar		Ovidukt	
	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ
Tier 73	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 74	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Tier 75	1	2,54 x10 <sup>4</sup>	1	9,09 x10 <sup>2</sup>	1	0	0	0	0	0
Tier 76	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 78	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0

Tab. 28 Sektion 2 (22.06.2010, sieben Tage *p.inf.*): Organbesiedelung (qualitativ und quantitativ) mit *S. Enteritidis*; Keimzahlen in KbE/g und qualitativer Nachweis mit 0= negativ und 1= positiv

	Caecumwand		Caecuminhalt		Leber		Ovar		Ovidukt	
	qualitativ	Quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ
Tier 103	1	8,00 x10 <sup>2</sup>	1	0	0	0	0	0	0	0
Tier 104	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 105	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 106	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Tier 107	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 108	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

#### Versuchszeitpunkt 54. LW

Tab. 29 Sektion 1 (09.09.2010, zwei Tage *p.inf.*): Organbesiedelung (qualitativ und quantitativ) mit *S. Enteritidis*; Keimzahlen in KbE/g und qualitativer Nachweis mit 0= negativ und 1= positiv

	Caecumwand		Caecuminhalt		Leber		Ovar		Ovidukt	
	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ
Tier 73	1	1,80 x10 <sup>1</sup>	1	2,72 x10 <sup>2</sup>	0	0	0	0	0	0
Tier 74	1	2,00 x10 <sup>1</sup>	1	2,72 x10 <sup>2</sup>	0	0	0	0	0	0
Tier 75	0	0	1	9,00 x10 <sup>2</sup>	0	0	0	0	0	0
Tier 76	0	0	0	0	1	7,28 x10 <sup>1</sup>	0	0	0	0
Tier 77	1	3,10 x10 <sup>3</sup>	1	1,18 x10 <sup>4</sup>	1	9,10 x10 <sup>1</sup>	1	1,80 x10 <sup>1</sup>	0	0
Tier 78	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 30 Sektion 2 (14.09.2010, sieben Tage *p.inf.*): Organbesiedelung (qualitativ und quantitativ) mit *S. Enteritidis*; Keimzahlen in KbE/g und qualitativer Nachweis mit 0= negativ und 1= positiv

	Caecumwand		Caecuminhalt		Leber		Ovar		Ovidukt	
	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ
Tier 103	0	0	0	0	1	2,36 x10 <sup>2</sup>	0	0	0	0
Tier 104	1	0	1	9,00 x10 <sup>1</sup>	1	3,90 x10 <sup>2</sup>	1	2,72 x10 <sup>2</sup>	0	0
Tier 105	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 106	0	0	0	0	1	2,46 x10 <sup>2</sup>	0	0	0	0
Tier 107	1	1,80 x10 <sup>1</sup>	0	0	1	6,36 x10 <sup>1</sup>	0	0	0	0
Tier 108	0	0	0	0	1	2,72 x10 <sup>1</sup>	0	0	0	0

### Versuchszeitpunkt 69. LW

Tab. 31 Sektion 1 (14.01.2011, zwei Tage *p.inf.*): Organbesiedelung (qualitativ und quantitativ) mit *S. Enteritidis*; Keimzahlen in KbE/g und qualitativer Nachweis mit 0= negativ und 1= positiv

	Caecumwand		Caecuminhalt		Leber		Ovar		Ovidukt	
	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ
Tier 73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 76	1	1,82 x10 <sup>1</sup>	1	2,00 x10 <sup>3</sup>	1	0	0	0	0	0
Tier 77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 78	1	1,82 x10 <sup>1</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 32 Sektion 2 (19.01.2011, sieben Tage *p.inf.*): Organbesiedelung (qualitativ und quantitativ) mit *S. Enteritidis*; Keimzahlen in KbE/g und qualitativer Nachweis mit 0= negativ und 1= positiv

	Caecumwand		Caecuminhalt		Leber		Ovar		Ovidukt	
	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ
Tier 103	0	0	0	0	1	2,14 x10 <sup>2</sup>	0	0	0	0
Tier 104	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 105	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 106	0	0	0	0	1	8,12 x10 <sup>1</sup>	0	0	0	0
Tier 107	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 108	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Gruppe D**

**Versuchszeitpunkt 39. LW**

Tab. 33 Sektion 1 (17.06.2010, zwei Tage *p.inf.*): Organbesiedelung (qualitativ und quantitativ) mit *S. Enteritidis*; Keimzahlen in KbE/g und qualitativer Nachweis mit 0= negativ und 1= positiv

	Caecumwand		Caecuminhalt		Leber		Ovar		Ovidukt	
	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ
Tier 79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 81	1	0	1	5,64 x10 <sup>3</sup>	1	0	0	0	0	0
Tier 82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 83	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 34 Sektion 2 (22.06.2010, sieben Tage *p.inf.*): Organbesiedelung (qualitativ und quantitativ) mit *S. Enteritidis*; Keimzahlen in KbE/g und qualitativer Nachweis mit 0= negativ und 1= positiv

	Caecumwand		Caecuminhalt		Leber		Ovar		Ovidukt	
	qualitativ	Quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ
Tier 109	1	2,00 x10 <sup>2</sup>	1	2,10 x10 <sup>3</sup>	1	1,64 x10 <sup>2</sup>	0	0	0	0
Tier 110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 111	1	2,10 x10 <sup>3</sup>	1	9,09 x10 <sup>1</sup>	1	1,45 x10 <sup>3</sup>	0	0	0	0
Tier 112	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Tier 113	0	0	0	0	1	6,00 x10 <sup>2</sup>	0	0	0	0
Tier 114	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0

**Versuchszeitpunkt 54. LW**

Tab. 35 Sektion 1 (09.09.2010, zwei Tage *p.inf.*): Organbesiedelung (qualitativ und quantitativ) mit *S. Enteritidis*; Keimzahlen in KbE/g und qualitativer Nachweis mit 0= negativ und 1= positiv

	Caecumwand		Caecuminhalt		Leber		Ovar		Ovidukt	
	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ
Tier 67	1	2,00 x10 <sup>1</sup>	1	9,00 x10 <sup>2</sup>	0	0	0	0	0	0
Tier 68	1	3,60 x10 <sup>1</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 69	1	4,90 x10 <sup>2</sup>	1	1,73 x10 <sup>3</sup>	1	2,00 x10 <sup>1</sup>	1	0	0	0
Tier 70	1	1,80 x10 <sup>1</sup>	1	3,60 x10 <sup>2</sup>	0	0	0	0	0	0
Tier 71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 72	1	0	1	9,00 x10 <sup>1</sup>	0	0	0	0	0	0

Tab. 36 Sektion 2 (14.09.2010, sieben Tage *p.inf.*): Organbesiedelung (qualitativ und quantitativ) mit *S. Enteritidis*; Keimzahlen in KbE/g und qualitativer Nachweis mit 0= negativ und 1= positiv

	Caecumwand		Caecuminhalt		Leber		Ovar		Ovidukt	
	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ
Tier 97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 98	1	$1,80 \times 10^2$	0	0	1	0	0	0	0	0
Tier 99	1	$1,80 \times 10^1$	0	0	1	$1,80 \times 10^1$	0	0	0	0
Tier 100	1	$2,00 \times 10^2$	0	0	1	0	1	$9,00 \times 10^0$	0	0
Tier 101	1	$3,80 \times 10^3$	1	$2,70 \times 10^2$	1	$1,36 \times 10^2$	0	0	0	0
Tier 102	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

### Versuchszeitpunkt 69. LW

Tab. 37 Sektion 1 (14.01.2011, zwei Tage *p.inf.*): Organbesiedelung (qualitativ und quantitativ) mit *S. Enteritidis*; Keimzahlen in KbE/g und qualitativer Nachweis mit 0= negativ und 1= positiv

	Caecumwand		Caecuminhalt		Leber		Ovar		Ovidukt	
	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ
Tier 79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 81	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 82	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Tier 83	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 84	0	0	1	$1,82 \times 10^2$	0	0	0	0	0	0

Tab. 38 Sektion 2 (19.01.2011, sieben Tage *p.inf.*): Organbesiedelung (qualitativ und quantitativ) mit *S. Enteritidis*; Keimzahlen in KbE/g und qualitativer Nachweis mit 0= negativ und 1= positiv

	Caecumwand		Caecuminhalt		Leber		Ovar		Ovidukt	
	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ
Tier109	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Tier110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier111	1	$8,00 \times 10^2$	1	$1,27 \times 10^3$	1	$1,36 \times 10^2$	0	0	0	0
Tier112	1	$2,91 \times 10^2$	1	$1,82 \times 10^2$	0	0	0	0	0	0
Tier113	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier114	0	0	1	$3,64 \times 10^2$	1	$9,00 \times 10^0$	1	0	0	0

## Gruppe E

### Versuchszeitpunkt 39. LW

Tab. 39 Sektion 1 (17.06.2010, zwei Tage *p.inf.*): Organbesiedelung (qualitativ und quantitativ) mit *S. Enteritidis*; Keimzahlen in KbE/g und qualitativer Nachweis mit 0= negativ und 1= positiv

	Caecumwand		Caecuminhalt		Leber		Ovar		Ovidukt	
	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ
Tier 85	1	1,20 x10 <sup>4</sup>	1	0	0	0	0	0	0	0
Tier 86	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 87	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 90	0	0	1	2,09 x10 <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0

Tab. 40 Sektion 2 (22.06.2010, sieben Tage *p.inf.*): Organbesiedelung (qualitativ und quantitativ) mit *S. Enteritidis*; Keimzahlen in KbE/g und qualitativer Nachweis mit 0= negativ und 1= positiv

	Caecumwand		Caecuminhalt		Leber		Ovar		Ovidukt	
	qualitativ	Quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ
Tier 115	1	2,00 x10 <sup>4</sup>	1	1,00 x10 <sup>5</sup>	1	0	0	0	0	0
Tier 116	1	7,26 x10 <sup>2</sup>	1	0	1	3,62 x10 <sup>2</sup>	0	0	0	0
Tier 117	1	2,00 x10 <sup>2</sup>	1	0	1	3,62 x10 <sup>2</sup>	0	0	0	0
Tier 118	1	4,90 x10 <sup>4</sup>	1	9,27 x10 <sup>3</sup>	1	0	1	0	0	0
Tier 119	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Tier 120	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0

### Versuchszeitpunkt 54. LW

Tab. 41 Sektion 1 (09.09.2010, zwei Tage *p.inf.*): Organbesiedelung (qualitativ und quantitativ) mit *S. Enteritidis*; Keimzahlen in KbE/g und qualitativer Nachweis mit 0= negativ und 1= positiv

	Caecumwand		Caecuminhalt		Leber		Ovar		Ovidukt	
	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ
Tier 61	1	0	1	3,60 x10 <sup>2</sup>	1	0	0	0	0	0
Tier 62	1	2,40 x10 <sup>4</sup>	1	2,36 x10 <sup>4</sup>	1	3,62 x10 <sup>1</sup>	0	0	0	0
Tier 63	1	1,27 x10 <sup>4</sup>	1	2,36 x10 <sup>3</sup>	1	0	0	0	0	0
Tier 64	1	1,40 x10 <sup>2</sup>	1	2,72 x10 <sup>2</sup>	0	0	0	0	0	0
Tier 65	1	1,09 x10 <sup>2</sup>	1	3,45 x10 <sup>3</sup>	1	7,20 x10 <sup>1</sup>	0	0	0	0
Tier 66	1	3,26 x10 <sup>4</sup>	1	9,00 x10 <sup>1</sup>	1	0	0	0	0	0

Tab. 42 Sektion 2 (14.09.2010, sieben Tage *p.inf.*): Organbesiedelung (qualitativ und quantitativ) mit *S. Enteritidis*; Keimzahlen in KbE/g und qualitativer Nachweis mit 0= negativ und 1= positiv

	Caecumwand		Caecuminhalt		Leber		Ovar		Ovidukt	
	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ
Tier 91	1	2,36 x10 <sup>2</sup>	0	0	1	7,28 x10 <sup>1</sup>	0	0	0	0
Tier 92	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 93	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 94	1	1,80 x10 <sup>1</sup>	0	0	1	4,46 x10 <sup>2</sup>	0	0	0	0
Tier 95	1	9,00 x10 <sup>2</sup>	1	9,00 x10 <sup>2</sup>	1	9,00 x10 <sup>0</sup>	0	0	0	0
Tier 96	0	0	0	0	1	5,46 x10 <sup>1</sup>	0	0	0	0

### Versuchszeitpunkt 69. LW

Tab. 43 Sektion 1 (14.01.2011, zwei Tage *p.inf.*): Organbesiedelung (qualitativ und quantitativ) mit *S. Enteritidis*; Keimzahlen in KbE/g und qualitativer Nachweis mit 0= negativ und 1= positiv

	Caecumwand		Caecuminhalt		Leber		Ovar		Ovidukt	
	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ
Tier 85	1	3,63 x10 <sup>2</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 86	1	2,73 x10 <sup>2</sup>	1	7,27 x10 <sup>2</sup>	1	0	0	0	0	0
Tier 87	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 89	1	7,27 x10 <sup>1</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 44 Sektion 2 (19.01.2011, sieben Tage *p.inf.*): Organbesiedelung (qualitativ und quantitativ) mit *S. Enteritidis*; Keimzahlen in KbE/g und qualitativer Nachweis mit 0= negativ und 1= positiv

	Caecumwand		Caecuminhalt		Leber		Ovar		Ovidukt	
	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ	qualitativ	quantitativ
Tier 115	1	3,36 x10 <sup>1</sup>	0	0	1	3,36 x10 <sup>2</sup>	1	2,72 x10 <sup>1</sup>	0	0
Tier 116	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 117	0	0	0	0	1	7,91 x10 <sup>2</sup>	0	0	0	0
Tier 118	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 119	1	1,81 x10 <sup>2</sup>	0	0	1	1,36 x10 <sup>2</sup>	1	1,79 x10 <sup>3</sup>	0	0
Tier 120*	1	4,50 x10 <sup>3</sup>	0	3,00 x10 <sup>3</sup>	1	1,09 x10 <sup>2</sup>	1	0	0	0

\* ist vor der Sektion 2 verstorben, weshalb es nicht zur Sektion zur Verfügung stand



## Befunde der Kloakentupfer

### Gruppe A

#### Versuchszeitpunkt 39. LW

Tab. 45 Tiere der Sektion 1 (zwei Tage *p.inf.*) und Tiere der Sektion 2 (sieben Tage *p.inf.*)

	KT 1d. <i>p.inf.</i>
Tier 61	0
Tier 62	0
Tier 63	0
Tier 64	0
Tier 65	0
Tier 66	0

	KT 1d. <i>p.inf.</i>	KT 3d. <i>p.inf.</i>	KT 5d. <i>p.inf.</i>
Tier 91	0	0	0
Tier 92	0	0	0
Tier 93	0	0	0
Tier 94	0	0	0
Tier 95	0	0	0
Tier 96	0	0	0

#### Versuchszeitpunkt 54. LW

Tab. 46 Tiere der Sektion 1 (zwei Tage *p.inf.*) und Tiere der Sektion 2 (sieben Tage *p.inf.*)

	KT 1d. <i>p.inf.</i>
Tier 85	0
Tier 86	0
Tier 87	0
Tier 88	0
Tier 89	0
Tier 90	0

	KT 1d. <i>p.inf.</i>	KT 3d. <i>p.inf.</i>	KT 5d. <i>p.inf.</i>
Tier 115	0	0	0
Tier 116	0	0	0
Tier 117	0	1	0
Tier 118	0	1	0
Tier 119	0	0	0
Tier 120	0	1	0

#### Versuchszeitpunkt 69. LW

Tab. 47 Tiere der Sektion 1 (zwei Tage *p.inf.*) und Tiere der Sektion 2 (sieben Tage *p.inf.*)

	KT 1d. <i>p.inf.</i>
Tier 61	0
Tier 62	1
Tier 63	0
Tier 64	0
Tier 65	0
Tier 66	0

	KT 1d. <i>p.inf.</i>	KT 3d. <i>p.inf.</i>	KT 5d. <i>p.inf.</i>
Tier 91	0	0	0
Tier 92	0	0	0
Tier 93	1	0	0
Tier 94	0	0	0
Tier 95	1	1	0
Tier 96	0	1	1

KT= Kloakentupfer; d.*p.inf.*= Tag(e) nach der Infektion;

0= kein Salmonellennachweis; 1= qualitativer Salmonellennachweis positiv

**Gruppe B**

**Versuchszeitpunkt 39. LW**

Tab. 48 Tiere der Sektion 1 (zwei Tage *p.inf.*) und Tiere der Sektion 2 (sieben Tage *p.inf.*)

	KT 1d. <i>p.inf.</i>
Tier 67	0
Tier 68	0
Tier 69	0
Tier 70	0
Tier 71	0
Tier 72	1

	KT 1d. <i>p.inf.</i>	KT 3d. <i>p.inf.</i>	KT 5d. <i>p.inf.</i>
Tier 97	0	0	0
Tier 98	0	0	0
Tier 99	0	0	0
Tier 100	0	0	0
Tier 101	0	0	0
Tier 102	0	0	0

**Versuchszeitpunkt 54. LW**

Tab. 49 Tiere der Sektion 1 (zwei Tage *p.inf.*) und Tiere der Sektion 2 (sieben Tage *p.inf.*)

	KT 1d. <i>p.inf.</i>
Tier 79	1
Tier 80	0
Tier 81	0
Tier 82	1
Tier 83	0
Tier 84	0

	KT 1d. <i>p.inf.</i>	KT 2d. <i>p.inf.</i>	KT 5d. <i>p.inf.</i>
Tier 109	0	1	0
Tier 110	0	1	0
Tier 111	0	1	0
Tier 112	1	1	1
Tier 113	1	1	1
Tier 114	0	1	0

**Versuchszeitpunkt 69. LW**

Tab. 50 Tiere der Sektion 1 (zwei Tage *p.inf.*) und Tiere der Sektion 2 (sieben Tage *p.inf.*)

	KT 1d. <i>p.inf.</i>
Tier 67	0
Tier 68	0
Tier 69	0
Tier 70	0
Tier 71	0
Tier 72	1

	KT 1d. <i>p.inf.</i>	KT 3d. <i>p.inf.</i>	KT 5d. <i>p.inf.</i>
Tier 97	0	0	0
Tier 98	0	0	0
Tier 99	0	0	0
Tier 100	0	0	0
Tier 101	1	0	0
Tier 102	0	0	0

**Gruppe C**

**Versuchszeitpunkt 39. LW**

Tab. 51 Tiere der Sektion 1 (zwei Tage *p.inf.*) und Tiere der Sektion 2 (sieben Tage *p.inf.*)

	KT 1d. <i>p.inf.</i>		KT 1d. <i>p.inf.</i>	KT 3d. <i>p.inf.</i>	KT 5d. <i>p.inf.</i>
Tier 73	0	Tier 103	0	0	0
Tier 74	1	Tier 104	0	0	0
Tier 75	1	Tier 105	0	0	0
Tier 76	0	Tier 106	0	0	0
Tier 77	0	Tier 107	0	0	0
Tier 78	0	Tier 108	0	0	0

**Versuchszeitpunkt 54. LW**

Tab. 52 Tiere der Sektion 1 (zwei Tage *p.inf.*) und Tiere der Sektion 2 (sieben Tage *p.inf.*)

Tier	KT 1d. <i>p.inf.</i>	Tier	KT 1d. <i>p.inf.</i>	KT 3d. <i>p.inf.</i>	KT 5d. <i>p.inf.</i>
Tier 73	0	Tier 103	0	1	0
Tier 74	0	Tier 104	0	1	0
Tier 75	1	Tier 105	0	1	0
Tier 76	1	Tier 106	0	1	0
Tier 77	0	Tier 107	1	0	0
Tier 78	1	Tier 108	0	1	0

**Versuchszeitpunkt 69. LW**

Tab. 53 Tiere der Sektion 1 (zwei Tage *p.inf.*) und Tiere der Sektion 2 (sieben Tage *p.inf.*)

	KT 1d. <i>p.inf.</i>		KT 1d. <i>p.inf.</i>	KT 3d. <i>p.inf.</i>	KT 5d. <i>p.inf.</i>
Tier 73	0	Tier 103	0	0	0
Tier 74	0	Tier 104	0	0	0
Tier 75	0	Tier 105	0	0	0
Tier 76	0	Tier 106	0	0	0
Tier 77	0	Tier 107	0	0	0
Tier 78	0	Tier 108	0	0	0

**Gruppe D**

**Versuchszeitpunkt 39. LW**

Tab. 54 Tiere der Sektion 1 (zwei Tage *p.inf.*) und Tiere der Sektion 2 (sieben Tage *p.inf.*)

	KT 1d. <i>p.inf.</i>		KT 1d. <i>p.inf.</i>	KT 3d. <i>p.inf.</i>	KT 5d. <i>p.inf.</i>
Tier 79	1	Tier 109	0	1	0
Tier 80	1	Tier 110	0	0	0
Tier 81	1	Tier 111	1	1	0
Tier 82	0	Tier 112	0	0	0
Tier 83	0	Tier 113	0	0	0
Tier 84	0	Tier 114	0	0	0

**Versuchszeitpunkt 54. LW**

Tab. 55 Tiere der Sektion 1 (zwei Tage *p.inf.*) und Tiere der Sektion 2 (sieben Tage *p.inf.*)

	KT 1d. <i>p.inf.</i>		KT 1d. <i>p.inf.</i>	KT 3d. <i>p.inf.</i>	KT 5d. <i>p.inf.</i>
Tier 67	0	Tier 97	0	1	1
Tier 68	0	Tier 98	1	1	1
Tier 69	0	Tier 99	0	0	1
Tier 70	0	Tier 100	0	1	0
Tier 71	0	Tier 101	0	0	1
Tier 72	1	Tier 102	0	1	0

**Versuchszeitpunkt 69. LW**

Tab. 56 Tiere der Sektion 1 (zwei Tage *p.inf.*) und Tiere der Sektion 2 (sieben Tage *p.inf.*)

	KT 1d. <i>p.inf.</i>		KT 1d. <i>p.inf.</i>	KT 3d. <i>p.inf.</i>	KT 5d. <i>p.inf.</i>
Tier 79	0	Tier 109	0	1	0
Tier 80	0	Tier 110	0	0	0
Tier 81	0	Tier 111	1	0	1
Tier 82	0	Tier 112	1	1	0
Tier 83	1	Tier 113	0	0	0
Tier 84	0	Tier 114	1	0	0

**Gruppe E**

**Versuchszeitpunkt 39. LW**

Tab. 57 Tiere der Sektion 1 (zwei Tage *p.inf.*) und Tiere der Sektion 2 (sieben Tage *p.inf.*)

	KT 1d. <i>p.inf.</i>
Tier 85	1
Tier 86	1
Tier 87	1
Tier 88	1
Tier 89	1
Tier 90	1

	KT 1d. <i>p.inf.</i>	KT 3d. <i>p.inf.</i>	KT 5d. <i>p.inf.</i>
Tier 115	1	1	0
Tier 116	0	0	0
Tier 117	1	1	0
Tier 118	1	1	0
Tier 119	0	0	0
Tier 120	0	0	0

**Versuchszeitpunkt 54. LW**

Tab. 58 Tiere der Sektion 1 (zwei Tage *p.inf.*) und Tiere der Sektion 2 (sieben Tage *p.inf.*)

	KT 1d. <i>p.inf.</i>
Tier 61	0
Tier 62	0
Tier 63	0
Tier 64	0
Tier 65	0
Tier 66	0

	KT 1d. <i>p.inf.</i>	KT 3d. <i>p.inf.</i>	KT 5d. <i>p.inf.</i>
Tier 91	0	0	0
Tier 92	0	1	0
Tier 93	1	1	0
Tier 94	1	1	1
Tier 95	0	0	0
Tier 96	0	0	0

**Versuchszeitpunkt 69. LW**

Tab. 59 Tiere der Sektion 1 (zwei Tage *p.inf.*) und Tiere der Sektion 2 (sieben Tage *p.inf.*)

	KT 1d. <i>p.inf.</i>
Tier 85	0
Tier 86	0
Tier 87	0
Tier 88	0
Tier 89	0
Tier 90	0

	KT 1d. <i>p.inf.</i>	KT 3d. <i>p.inf.</i>	KT 5d. <i>p.inf.</i>
Tier 115	0	0	0
Tier 116	0	0	0
Tier 117	0	0	0
Tier 118	1	1	0
Tier 119	1	0	0
Tier 120*	0	-	-

\*Tier war vor Entnahme des KT 3 d.*p.inf.* verstorben.

## 10 DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Uwe Tryen für die Überlassung des Promotionsthemas und die Anstellung am Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Universität Leipzig danken.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Institutes für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen bedanken, die mir stets tat- und fachkräftig zur Seite standen. Dabei gilt Dr. Timo Homeier-Bachmann besonderer Dank für die fachliche Betreuung während der Arbeit und der stetigen Bereitschaft auf Fragen zu antworten, Probleme zu lösen und Diskussionen zu führen. Anja Parentin bin ich sehr dankbar für die erfreuliche und fruchtbare Zusammenarbeit bei der Durchführung der Versuche und deren Auswertung. Eveline Brumme und insbesondere Dana Rüster möchte ich danken für die Geduld und die Unterstützung nicht nur bei den Laborarbeiten.

Für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des „ZUKUNFTSFORUM Landwirtschaft“ danke ich dem Freistaat Sachsen und dem Sächsischen Geflügelwirtschaftsverband, insbesondere Herrn Dr. Drobisch.

Herrn Lutz Gumpert möchte ich dafür danken, dass er uns beim Euthanasieren der Tiere behilflich war und uns seine Materialien dafür zur Verfügung gestellt hat.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, möchte ich von Herzen danken für die stetige Unterstützung in jeglicher Hinsicht in jeder Lebenslage.

Danken möchte ich auch meinem liebsten Florian, der mir während der Doktorarbeit immer zur Seite stand und für mich da war.

Allen Freunden und Kommilitonen möchte ich danken, die mich während dem Studium und der Promotion begleitet und aufgemuntert haben. Dabei möchte ich besonders Janne Schöning danken, mit deren Unterstützung ich stets die Freude am Studium der Tiermedizin wiederfand.